



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Caracterización electrofisiológica y farmacológica del
canal Slo3 en células espermatozógenas de ratón

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

VERÓNICA LOYO CELIS

Director: Dr. Gerardo José Orta Salazar,

Instituto de Biotecnología, UNAM

Asesora: Dra. María del Carmen García Rodríguez,
FES Zaragoza, UNAM



México, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon, en el departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM y fué financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México, 2013/9299 de A.D.).

Dedicatorias

- A mi familia por su apoyo incondicional, los amo.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio por permitirme aprender de pero sobretodo con ustedes.

En este andar hubo instantes extraordinarios (cursos, congresos, asados, pasteles, sesiones en el gringo, la palapa, sushi, etc) cuasi mágicos y también malos, gracias a todos por compartir estos momentos de vida conmigo. Especialmente a ti, la estudiante del laboratorio cuyas acciones siempre se rigen por una ética y bondad admirables, y debido a tu humildad y a mi profundo respeto omitiré tu nombre; no obstante, quiero expresar que sin ti no lo hubiese logrado. Eres un ser humano increíble.

- A mis amigos de la facultad, ya que el tiempo y la distancia no han opacado el hermoso vínculo que nos une, los quiero.
- A mi roommate por su valiosa compañía y paciencia.



Agradecimientos

- A mi tutor el Dr. Gerardo Orta por guiarme, cuestionarme e incentivar-me a dar lo mejor. Eres perfeccionista, reservado, inteligente, en ocasiones muy estricto y para mí un gran amigo (de esos que dejan los eufemismos de lado, plantean una realidad cruda y te invitan a crecer).
- Al Dr. Alberto Darszon por alentarme en todo y por su grandioso ejemplo académico y humano. Usted para mí es un científico en toda la extensión de la palabra una persona que me ha enseñado grandes lecciones de vida y a la cual valoro y respeto mucho (nunca olvidaré las sesiones matutinas y en ocasiones vespertinas de café donde en pocos minutos discutíamos algún tema y siempre me brindaba valiosos consejos).
- A mi asesora interna la Dra. Carmen García por su disposición en todo momento. Así como al comité revisor de este trabajo por sus comentarios, sugerencias y críticas puntuales las cuales enriquecieron este trabajo.
- A la Dra. Carmen Beltrán por mostrarme la belleza de la disciplina, fortaleza y entusiasmo en el trabajo y en la vida, al Dr. Takuya Nishigaki por sus críticas puntuales, retos y apoyo académico en pro de mi desarrollo profesional y a la Dra. Claudia Treviño por brindarme su confianza y por abrirme las puertas del laboratorio, espacio que poco a poco se convirtió en parte importante de mí existir.
- Al Dr. Enrique Balderas y a la Mtra. Ana Laura González por la revisión del anteproyecto de este trabajo, por compartirme su visión crítica del mundo y sobretodo por su amistad invaluable.
- Al Lic. José Luis De la Vega y a la Mtra. Elizabeth Mata por su apoyo y asistencia técnica. A la Mtra. Aura Orloff y al Biol. Francisco Herrera por proporcionarme ratones $Slo3^{-/-}$ para desarrollar este proyecto.
- Al Dr. Gonzalo Ferreira por compartirme un poco de su vasta experiencia durante su corta estancia en el laboratorio.

Índice

❖ Resumen	1
❖ Abstract	3
❖ Índice de abreviaturas	5
❖ Introducción	
Capítulo I: el espermatozoide	7
Espermatozoide	8
Espermatogénesis	10
La hiperactivación	14
La exocitosis acrosomal o reacción acrosomal	14
La capacitación	16
Capítulo II: los canales iónicos	20
Canales de K ⁺	23
Slo3	28
Fijación de área de membrana "patch-clamp"	32
❖ Justificación	37
❖ Hipótesis	37
❖ Objetivo general	38
❖ Objetivos particulares	38
❖ Material y métodos	
Soluciones para el registro de la corriente iónica del canal Slo3	39
Obtención de células espermatoogénicas redondas de ratón	40
Técnica de registro de corriente iónica: fijación de área de membrana	41
Preparación de electrodos de AgCl	41
Registros electrofisiológicos en células espermatoogénicas redondas	42
Análisis de datos	44
Análisis estadístico	45

❖ Resultados	
La I_K registrada en células espermatoogénicas redondas de ratón silvestre, es activada por la alcalinización del pH_i , así como, por pulsos de voltaje depolarizantes	46
La I_K registrada en células espermatoogénicas redondas de ratón silvestre es bloqueada con 50 μM de clofilium	50
La I_K registrada en células espermatoogénicas redondas de ratón nulo a Slo3 (Slo3 ^{-/-}) no se activa al alcalinizar el pH_i	52
El canal Slo3 se expresa en el 60% de las células espermatoogénicas redondas registradas	55
❖ Discusión	56
❖ Conclusiones	58
❖ Perspectivas	58
❖ Referencias	59
❖ Anexos	65

Resumen

La fecundación es el proceso mediante el cual se fusionan los gametos femenino (óvulo) y masculino (espermatozoide). Para llevar a cabo este evento de forma exitosa, el espermatozoide posee un conjunto particular de canales iónicos. Se ha detectado mediante diferentes técnicas la expresión del canal Slo3 en espermatozoides de ratón. La ausencia de este canal selectivo a potasio (K^+) que depende del voltaje y del pH intracelular (pHi), produce infertilidad en ratones nulos a Slo3 (Slo3^{-/-}).

En este trabajo nos enfocamos en investigar si el canal Slo3 está presente en células espermatogénicas de ratón y tiene las mismas características electrofisiológicas y farmacológicas que el estudiado en espermatozoides epididimales (maduros).

Se realizaron experimentos con la técnica electrofisiológica de fijación de área de membrana "patch-clamp" en la configuración de fijación de voltaje en célula completa. Se registró la corriente iónica de potasio (I_K) de células espermatogénicas redondas de ratones silvestres y de ratones Slo3^{-/-}. Encontramos que el canal Slo3 se expresa en el 60% de las células registradas de ratones silvestres (Slo3^{+/+}) y no en las de ratones Slo3^{-/-}. La corriente de K^+ del canal Slo3 (I_{KSlo3}) se activa a potenciales depolarizantes (>25 mV), a pHi alcalino (pH 8) y se bloquea con clofilium (50 μ M). La activación por voltaje y pHi así como el bloqueo de la corriente con el inhibidor clofilium muestran el mismo patrón reportado para la I_{KSlo3} de espermatozoides de ratón.

Estos hallazgos nos permiten sugerir que las células espermatogénicas, al ser células nativas, representan un excelente modelo de estudio del canal Slo3, esta característica aunada a su tamaño y forma permitirá realizar investigación farmacológica mediante la técnica de fijación de área de membrana automatizada "automated patch-clamp".

Palabras clave: Canal Slo3, células espermatogénicas, pHi, clofilium, fijación de área de membrana "patch-clamp".

Abstract

Fertilization is the process in which the female (egg) and male (sperm) gametes fuse. To perform this event successfully sperm require a particular set of ion channels. Slo3 channels have been recorded in mouse sperm using different techniques. The absence of this K^+ selective, voltage and intracellular pH dependent channel produces infertility in *knock out* Slo3 mice (Slo3^{-/-}).

Here we focus in investigating if the Slo3 channel is functionally present in mouse spermatogenic cells and if it has the same electrophysiological and pharmacological characteristics as those determined in more mature epididymal sperm. To answer this question, experiments were performed with the patch-clamp technique in the voltage-clamp-whole-cell configuration. In this manner, K^+ ionic currents (I_K) were recorded in round spermatogenic cells of wild-type (Slo3^{+/+}) and Slo3^{-/-} mice. We found that Slo3 channels expressed in 60% of the recorded wild-type mice spermatogenic cells and not in those from Slo3^{-/-} mice.

The Slo3 K^+ current (I_{KSlo3}) is activated at depolarizing potentials (>25 mV), at alkaline pHi (pH 8) and blocked by clofilium (50 μ M). The voltage and pHi activation and the current blocking with clofilium show the same pattern reported for I_{KSlo3} of mouse sperm.

These findings suggest that spermatogenic cells represent an excellent model to study Slo3 channel. Considering the shape and the relatively large size of these cells, possibly may allow the development of pharmacological studies using automated patch-clamp techniques.

Keywords: Slo3 channel, spermatogenic cells, pHi, clofilium, patch-clamp.

Índice de abreviaturas

- aa: aminoácidos
- AA: ácido araquidónico
- ADP: adenosín difosfato
- Ag: plata
- AgCl: cloruro de plata
- ATP: adenosín trifosfato
- Ba²⁺: bario
- Ca²⁺: calcio
- [Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular
- Cs⁺: cesio
- Δv: incremento de voltaje
- EC₅₀: concentración efectiva media
- E_m: potencial de membrana
- GFP: proteína verde fluorescente
- GΩ: gigaOhm
- G-V: gráfica conductancia-voltaje
- GYG: glicina-tirosina-glicina
- *hSlo3*: canal Slo3 de humano
- IC₅₀: concentración inhibitoria media
- I_K: corriente iónica de potasio
- I_{K_{Slo3}}: corriente de potasio del canal Slo3
- I-V: curva corriente-voltaje
- K⁺: ión potasio



- K_{ATP} : canal de potasio inactivado con ATP
- K_{ir} : canal de potasio rectificador entrante
- K_v : canal de potasio voltaje dependiente
- K_{2P} : canal de potasio de dos poros
- °K: grados Kelvin
- LRRC52: Subunidad γ del canal Slo3 denominada LRRC52 por sus siglas en inglés del término "leucin-rich-repeat-containing 52"
- μM : micromolar
- mM: milimolar
- $M\Omega$: megaOhm
- ms: milisegundo
- *mSlo3*: canal Slo3 de ratón
- Na^+ : sodio
- NaClO: hipoclorito de sodio
- NH_4Cl : cloruro de amonio
- O_2 : oxígeno
- pF: picofaradio
- pH_i: pH intracelular
- PIP_2 : fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
- pS: picosiemens
- R: arginina
- RA: reacción acrosomal
- RCK: dominio regulador de conductancia a potasio
- Slo3^{-/-}: nulo para el canal Slo3
- TEA: tetraetilamonio
- VSD: dominio del sensor de voltaje
- Zn^{2+} : zinc
- ZP: zona pelúcida

Introducción

Capítulo I: el espermatozoide



La fecundación es el proceso mediante el cual se fusionan los gametos femenino (óvulo) y masculino (espermatozoide), la adecuada fusión entre estas células conduce a la formación de un nuevo individuo (Darszon *et al*, 1999). En este proceso el cromosoma sexual contenido en el núcleo del espermatozoide determina el sexo del organismo (Knobil y Neill, 1993).

Espermatozoide

El espermatozoide (Figura 1) es una célula haploide y totipotencial (Vadnais *et al*, 2014). Si bien los espermatozoides de mamífero ostentan características comunes, existen diferencias entre las especies en la forma de la cabeza (Figura 2) y en el tamaño (Bellvé, 1998). En este sentido, la dimensión de los espermatozoides de humano de 19-97 μm es menor respecto a la de los espermatozoides de ratón de 121-127 μm (Cummins y Woodwall, 1985). Estructuralmente el espermatozoide posee dos regiones bien definidas: la cabeza y el flagelo, este último está unido a la cabeza a través del cuello (Cayetano, 1992).

- La cabeza para el caso de los espermatozoides de ratón mide aproximadamente de 5-11 μm de largo y de 2-3 μm de ancho (Cummins y Woodwall, 1985), en ella se encuentran el acrosoma y el núcleo. El espacio que hay entre el acrosoma y el núcleo está formado por componentes del citoesqueleto.
 - El acrosoma se origina a partir del aparato de Golgi, se localiza en la parte anterior terminal de la cabeza y contiene enzimas hidrolíticas necesarias para la exocitosis acrosomal (Anexo 1).
 - El núcleo tiene una cromatina altamente condensada y es de menor tamaño respecto al de las células somáticas.

- El flagelo constituye la estructura necesaria para la movilidad del espermatozoide. Esta integrado por el axonema (Figura 1), un complejo de microtubulos organizados en la disposición 9+2. Para facilitar su estudio se suele dividir en tres regiones la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Cayetano, 1992).

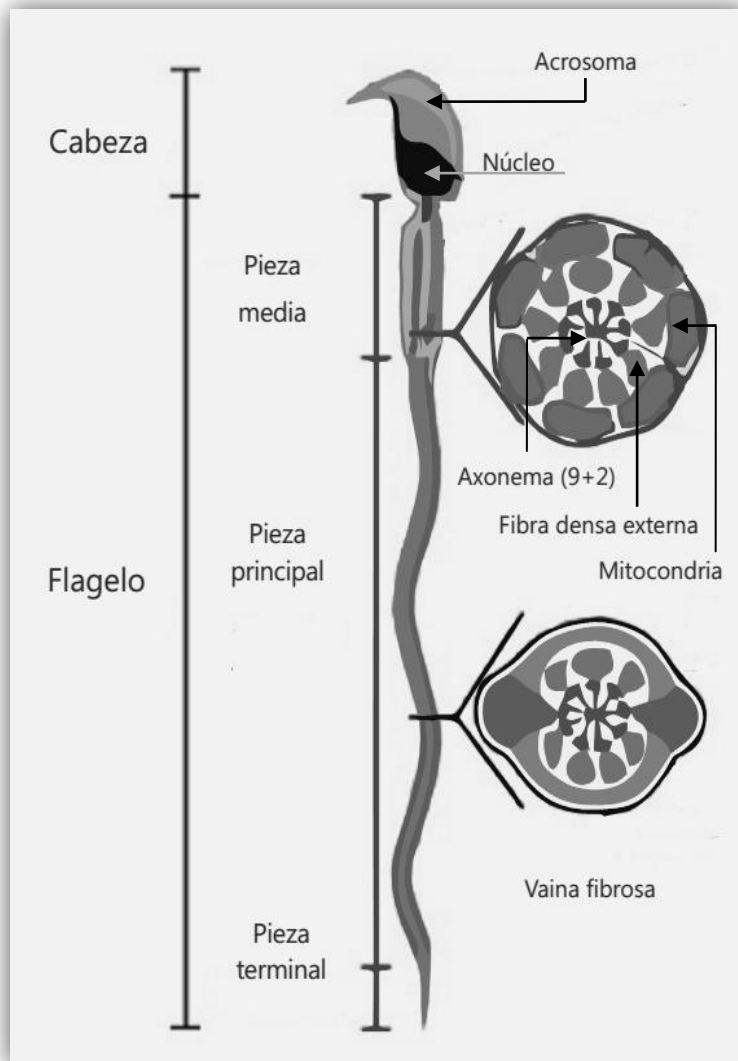


Figura 1. Estructura del espermatozoide de ratón. De izquierda a derecha se pueden observar la cabeza y el flagelo, regiones claramente definidas en este tipo celular. La cabeza está integrada por el acrosoma y el núcleo, señalados con una flecha negra y gris respectivamente. El flagelo se divide en tres regiones (pieza media, pieza principal y pieza terminal) y está constituido por la vaina fibrosa, seguida de un conjunto de mitocondrias y la fibra densa externa que rodea al axonema (Modificado de Vadnais *et al*, 2014).

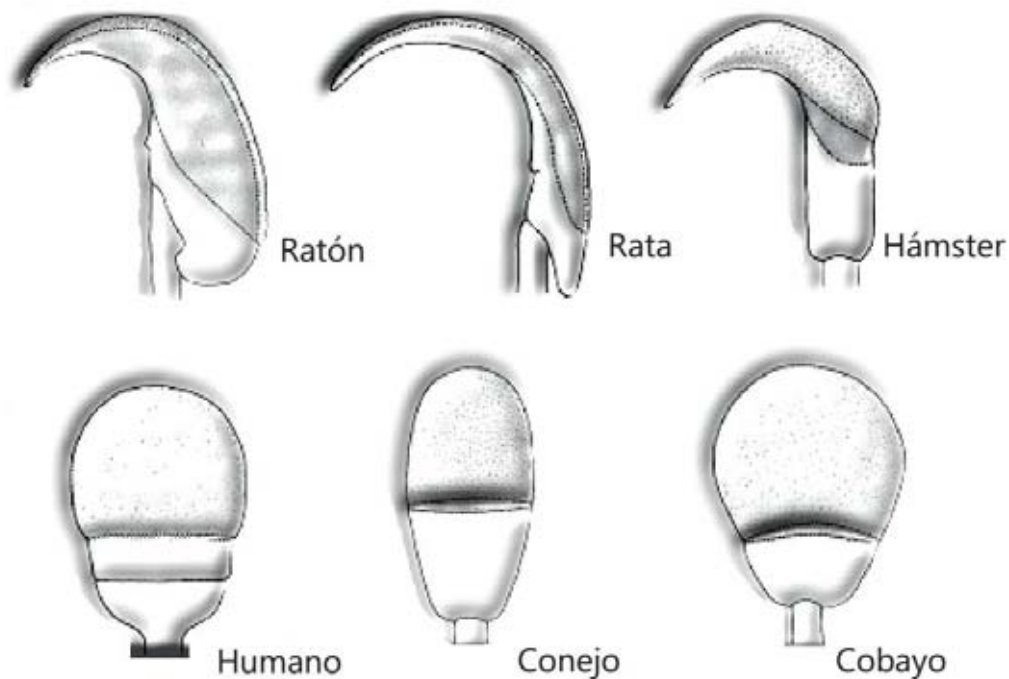


Figura 2. Forma de la cabeza de espermatozoides de mamífero. En este esquema se pueden apreciar las diferencias en la morfología de la cabeza de espermatozoides de distintas especies de mamíferos (Modificado de Knobil y Neill, 1993).

Espermatogénesis

La espermatogénesis (Figura 3) es el proceso en el cual se forman los gametos masculinos a partir de las células espermatogonias. Se ha estimado que el tiempo de duración de la espermatogénesis en ratones es de 34 días (Clermont, 1972).

Este evento inicia con la división mitótica de las espermatogonias, suceso en el que se da origen a las espermatogonias de tipo A, las cuales son sometidas a una subsecuente división mitótica obteniéndose así las espermatogonias de tipo B. Posterior a la primera fase de división mitótica se genera un estadio intermedio entre las espermatogonias de tipo A y B.

Una vez obtenidas las espermatogonias de tipo B finaliza la fase I de la espermatogénesis e inicia la fase II que contempla dos divisiones meióticas consecutivas.

Durante la meiosis I las espermatogonias de tipo B duplican su material genético, al término de este evento se forman los espermatocitos secundarios y en la meiosis II los espermatocitos secundarios se dividen dando lugar a las espermatidas redondas y los espermatozoides (Bellvé *et al*, 1977; Mays *et al*, 1995).

Lo referido anteriormente representa un enfoque simplificado de la espermatogénesis propuesto por los autores previamente citados, no obstante, este evento puede explicarse a partir de catorce o más etapas (Figura 4) que comprenden las previamente descritas más subdivisiones de estas de acuerdo a la especie estudiada, a la técnica empleada y al criterio aplicado para caracterizar los diferentes estadios celulares (Lagarrigue *et al*, 2011).

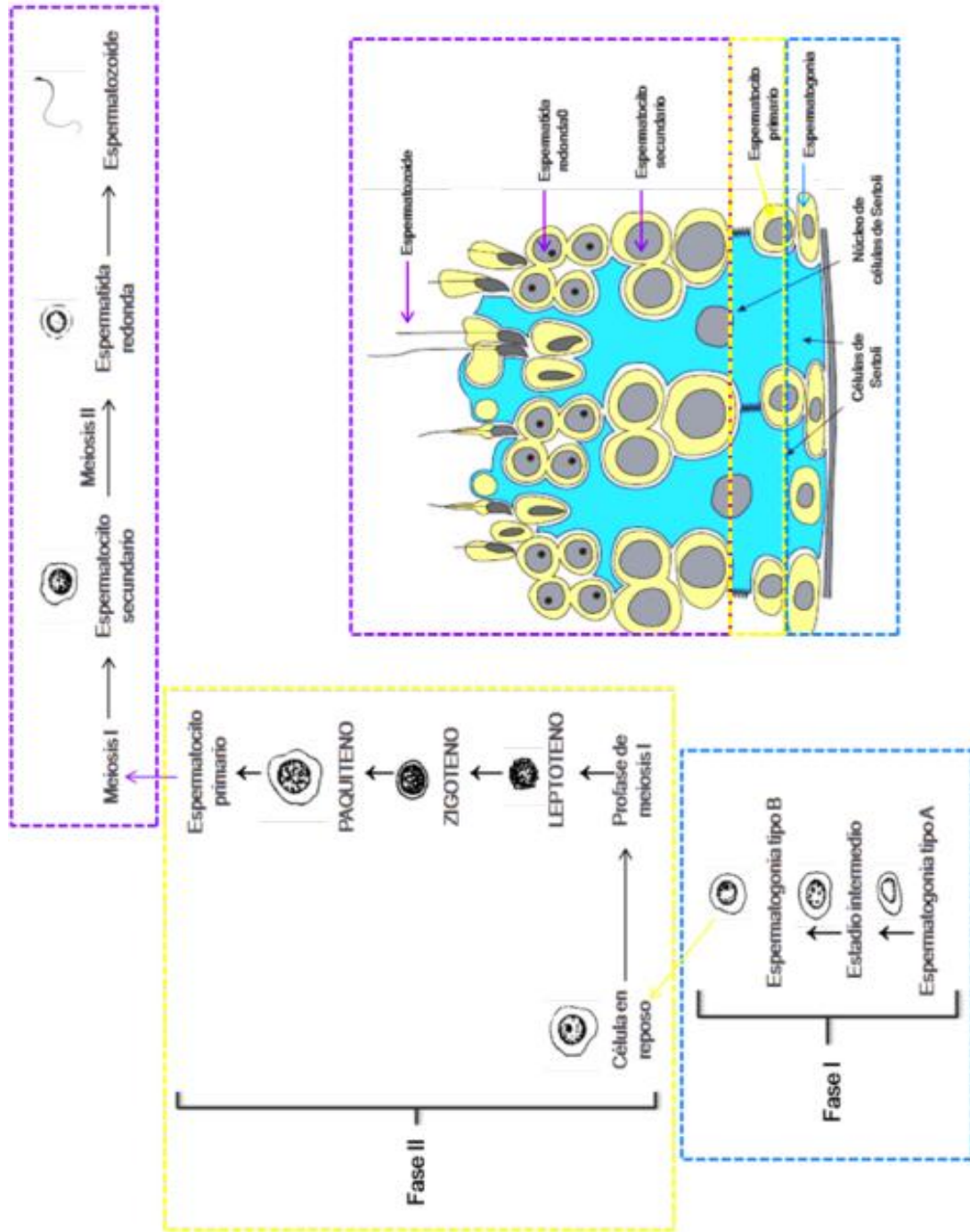


Figura 3. Esquema del proceso de espermatogénesis estudiado con un enfoque simplificado
 (Elaborado a partir de Mays et al, 1995 y Darszon et al, 2011).

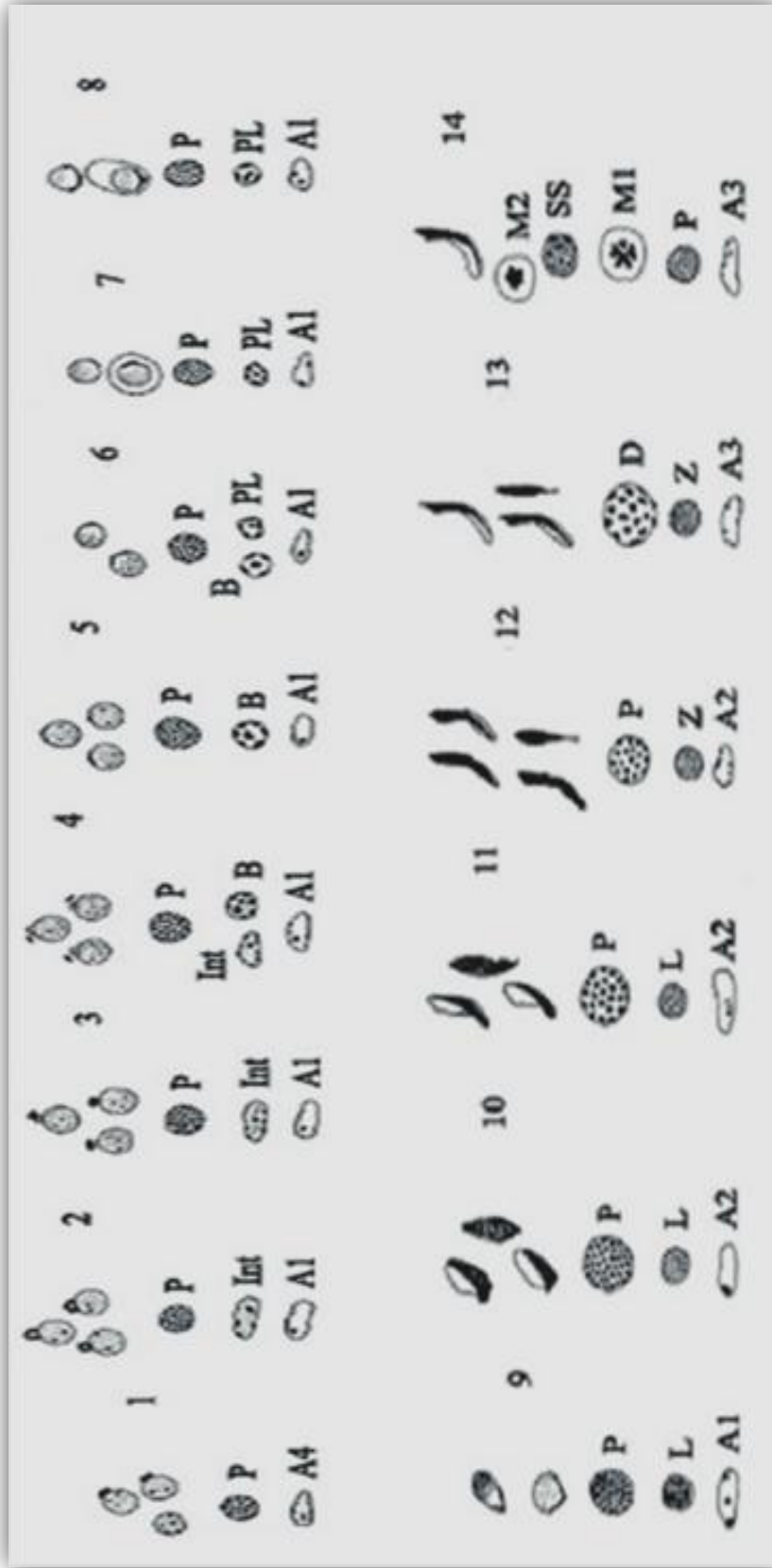


Figura 4. Esquema del proceso de espermatogénesis establecido a partir de imágenes obtenidas mediante *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*. Los números 1-14 representan las etapas de la espermatogénesis de ratón estudiada con MALDI. A1-A4=diferentes tipos de células espermatogonias A. B=espermatogonias B. D=división mitótica. Int=estadio celular intermedio (célula en reposo). L=leptoteno. M1=meiosis 1. M2=meiosis 2. P=paquiteno. PL=preleptoteno. SS=espermatozoides secundarios (MALDI) (Modificado de Lagarrigue *et al*, 2011)

Durante su viaje hacia el óvulo, el espermatozoide experimenta una serie de procesos fisiológicos dentro de los cuales destacan:

- **La hiperactivación**, que es un tipo de movilidad de los espermatozoides, la cual consiste en un nado progresivo con batido flagelar asimétrico y vigoroso de amplitud larga. Este tipo de movilidad es regulada por calcio (Ca^{2+}) y confiere mayor velocidad en el desplazamiento de los espermatozoides por el tracto reproductor femenino (Darszon *et al*, 2011).
- **La exocitosis acrosomal o reacción acrosomal**, que en la forma canónica (Figura 5), es concebida como el proceso secretorio en el cual el espermatozoide libera enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma, las cuales le permiten atravesar la zona pelúcida (ZP) que recubre al óvulo y fusionarse con este (Yanagimachi, 1994; Buffone *et al*, 2014).

No obstante, en el 2011 un grupo japonés demostró al efectuar experimentos con espermatozoides de ratones cuyo acrosoma estaba teñido con la proteína verde fluorescente (GFP), que la exocitosis acrosomal ocurre frecuentemente antes de que el espermatozoide entre en contacto con la ZP (Figura 6) (Gahlay *et al*, 2010; Inoue *et al*, 2011), estos hallazgos redefinieron el estudio de la reacción acrosomal.

Actualmente no se sabe con certeza que entidad molecular promueve la exocitosis acrosomal y cuál es el sitio y la cinética de ésta para que finalmente se lleve a cabo la fusión del espermatozoide con el óvulo.

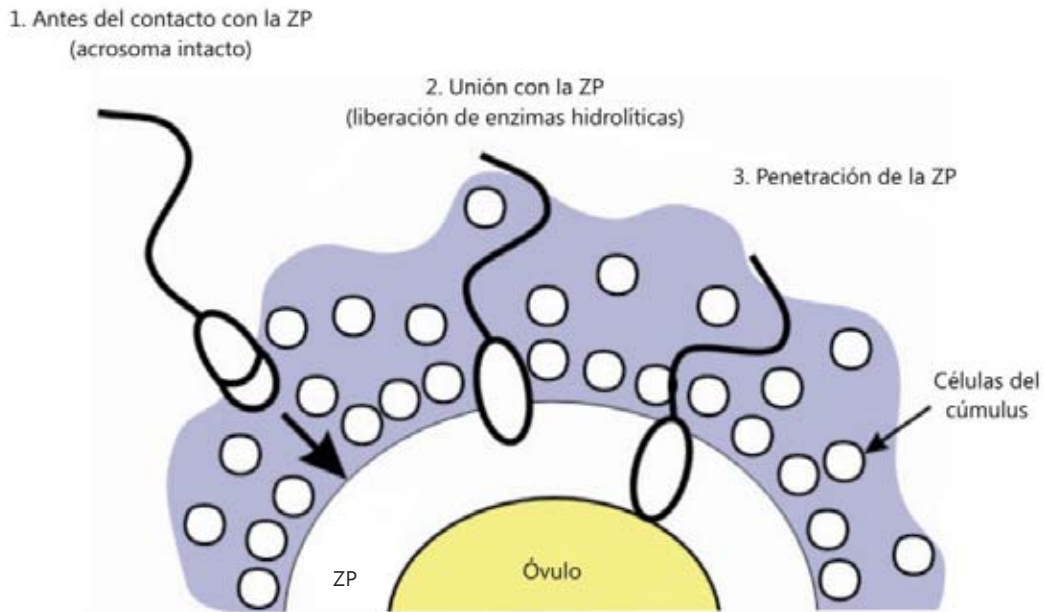


Figura 5. Modelo canónico de la reacción acrosomal. En esta imagen se describe de manera general la reacción acrosomal canónica. Para facilitar la penetración de la zona pelúcida (ZP) que rodea al óvulo y la posterior fusión con este, el espermatozoide libera enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma (Modificado de Darszon *et al*, 2011).

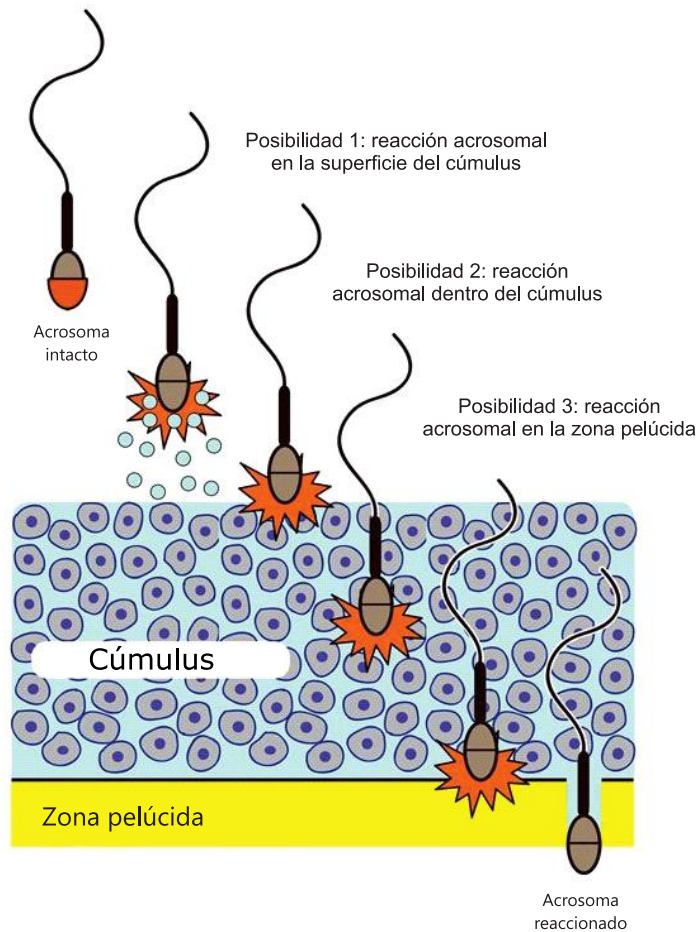


Figura 6. Modelo contemporáneo de la exocitosis acrosomal. En esta figura se pueden apreciar tres posibles sitios en los que se lleva a cabo la exocitosis o reacción acrosomal (RA). Las posibilidades 1 y 2 forman parte del modelo contemporáneo de la exocitosis acrosomal, en el cual, se propone que la RA ocurre antes de que el espermatozoide entre en contacto con la zona pelúcida (ZP) (Modificado de Buffone *et al*, 2014).

- **La capacitación**, que corresponde al evento en el cual los espermatozoides están expuestos a fluidos del tracto reproductor femenino y adquieren la capacidad para fecundar al óvulo (Austin, 1951; Chang, 1984; Lishko *et al*, 2012).

A lo largo de este proceso ocurre una remoción de colesterol, reorganización de la membrana celular, fosforilación de tirosinas, hiperpolarización del potencial de membrana e incremento del pH intracelular (pHi) (Figura 7) (Darszon *et al*, 2006; Salicioni *et al*, 2007; Morgan *et al*, 2008; Visconti, 2009; Visconti *et al*, 2011).

Uno de los iones clave en la capacitación es el Ca^{2+} , ya que se requiere un incremento en la concentración de calcio extracelular $[\text{Ca}^{2+}]_e$ de 100 a 200 μM (Fraser, 1992; Marín-Briggiler *et al*, 2003) para que se lleve a cabo este evento durante el cual, ocurre un incremento en la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de aproximadamente 75-130 nM (Baldi *et al*, 1991; DasGupta *et al*, 1993).

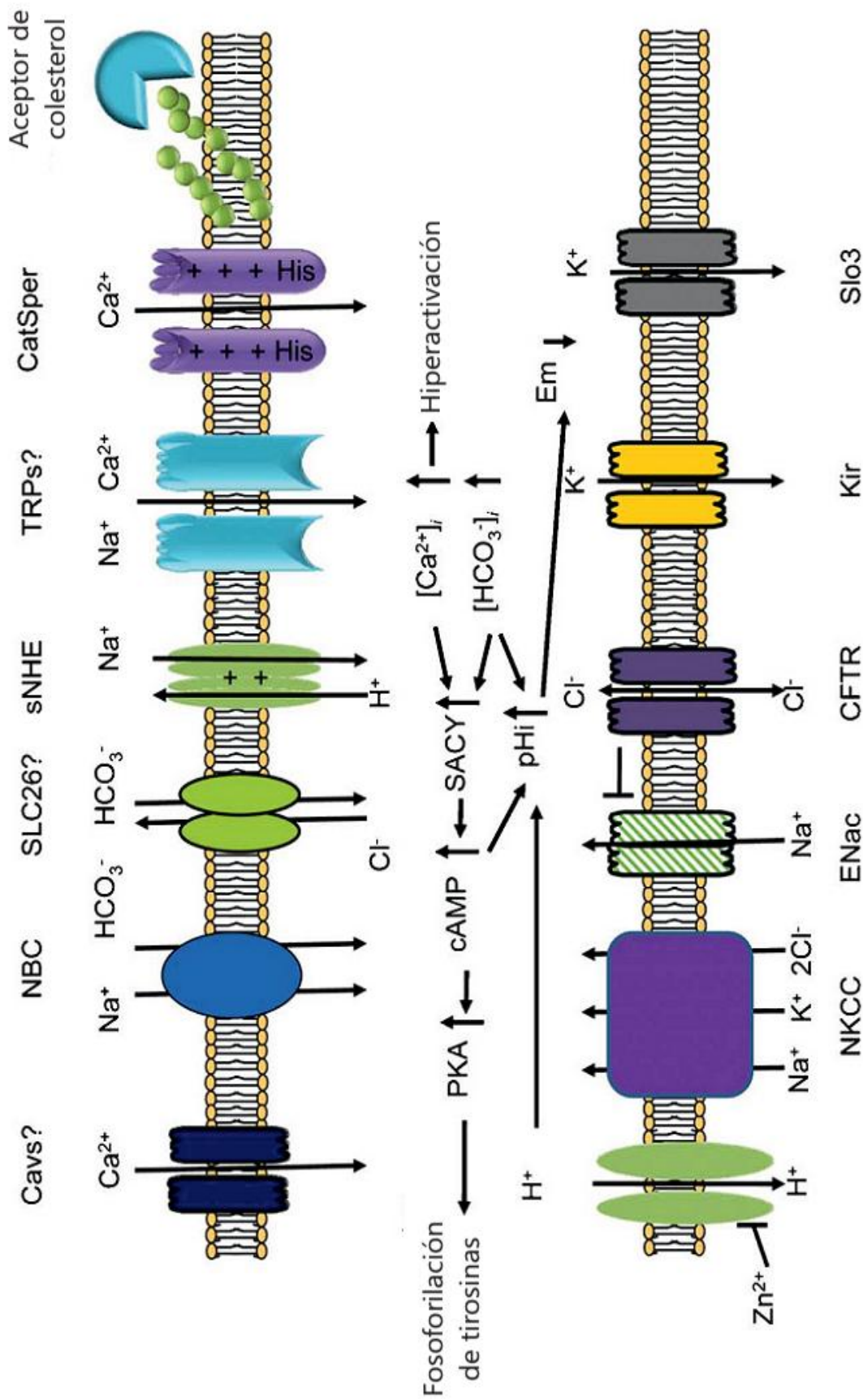


Figura 7. Modelo de la permeabilidad iónica y de eventos asociados a la capacitación del espermatozoide. Este modelo constituye una representación esquemática de las funciones y las inter-relaciones entre los canales y transportadores iónicos de moléculas involucradas en la capacitación. En él se pueden apreciar la remoción de colesterol, fosforilación de tirosinas, hiperpolarización del potencial de membrana, aumento del pH*i* e incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Modificado de Visconti *et al.*, 2011).

Los eventos descritos previamente son regulados por un conjunto particular de canales iónicos (entidades moleculares que describiré a detalle en el Capítulo II) presentes en el espermatozoide.

En la Figura 8 se puede observar la distribución de los canales iónicos detectados en espermatozoides de erizo de mar, ratón y humano.

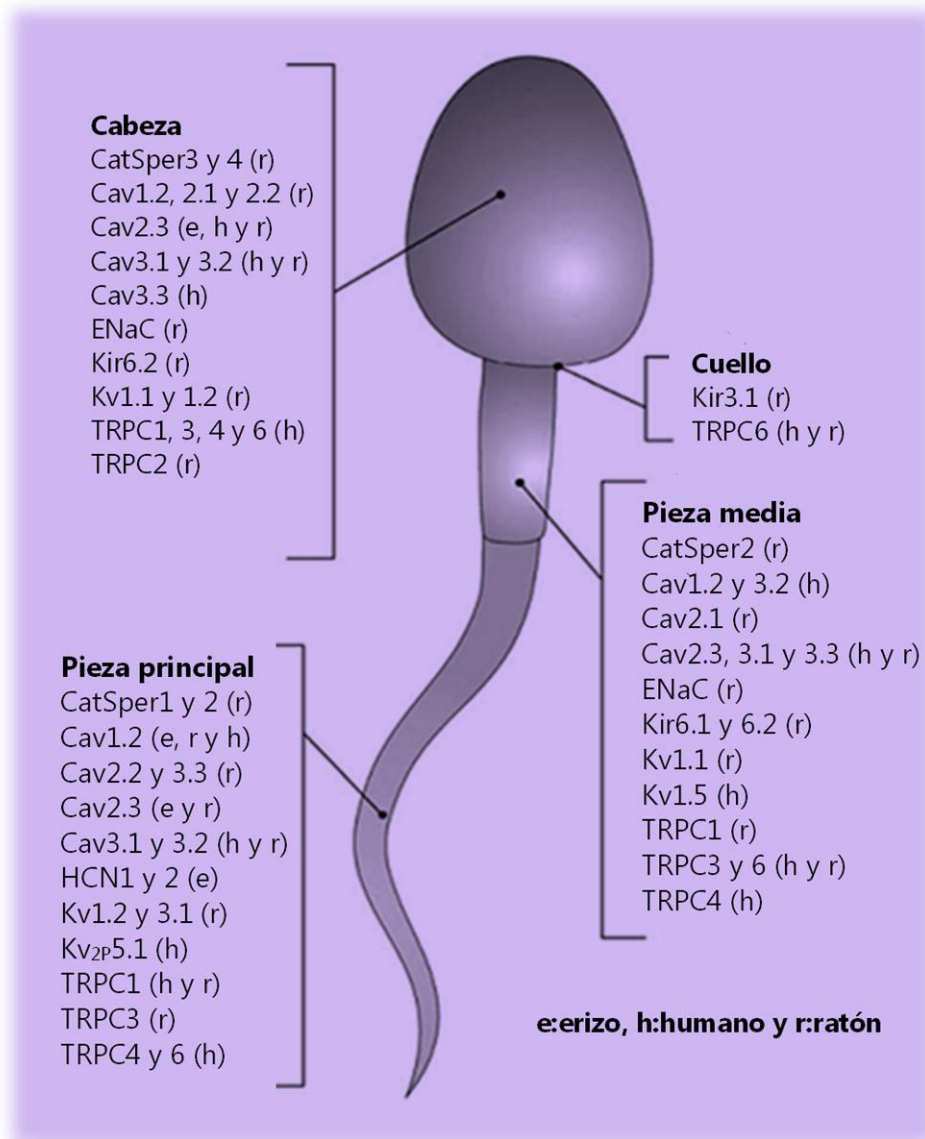
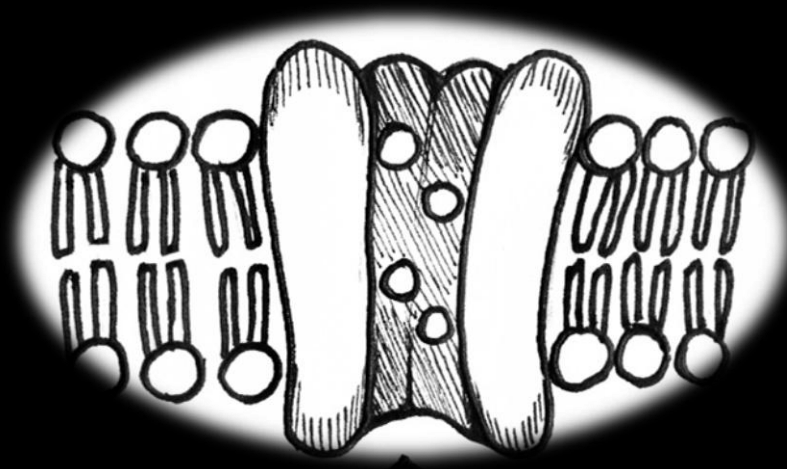


Figura 8. Distribución de canales iónicos en espermatozoides de diferentes especies. Distribución espacial de canales iónicos detectados en espermatozoides de erizo de mar, ratón y humano mediante inmunolocalización, RT-PCR, hibridación *in situ* y fijación de área de membrana "patch-clamp" (Modificado de Darszon *et al*, 2006).

Para comprender el papel funcional de los canales iónicos en la fertilización se han empleado diferentes técnicas tales como: mediciones del potencial de membrana, pH_i y $[Ca^{2+}]_i$; con colorantes fluorescentes, así como registros de corriente eléctrica de canales iónicos mediante bicapas lipídicas planas y fijación de área de membrana "patch-clamp" (Darszon *et al*, 1999).

De todos los canales iónicos detectados en el espermatozoide se han encontrado dos que son exclusivos de estas células, CatSper y Slo3, la ausencia de estos canales en ratones nulos (CatSper^{-/-} y Slo3^{-/-}) produce infertilidad (Ren *et al*, 2001; Qi *et al*, 2007; Santi *et al*, 2010; Chung *et al*, 2011; Zeng *et al*, 2011) y en humanos la ausencia de CatSper también produce infertilidad (Nishigaki *et al*, 2013; Jaiswal *et al*, 2014; Smith *et al*, 2013).

Capítulo II: los canales iónicos



Los canales iónicos (Figura 9) son poros macromoleculares que permiten el flujo de los iones a través de la membrana celular. Estas estructuras difieren de los transportadores, los cuales se unen específicamente a un soluto y sufren una serie de cambios conformacionales para transferir el soluto enlazado a través de la membrana (Hille, 2001).

La selectividad iónica de los canales está determinada por la carga, la naturaleza química, la hidratación, el radio iónico así como la estructura del poro.

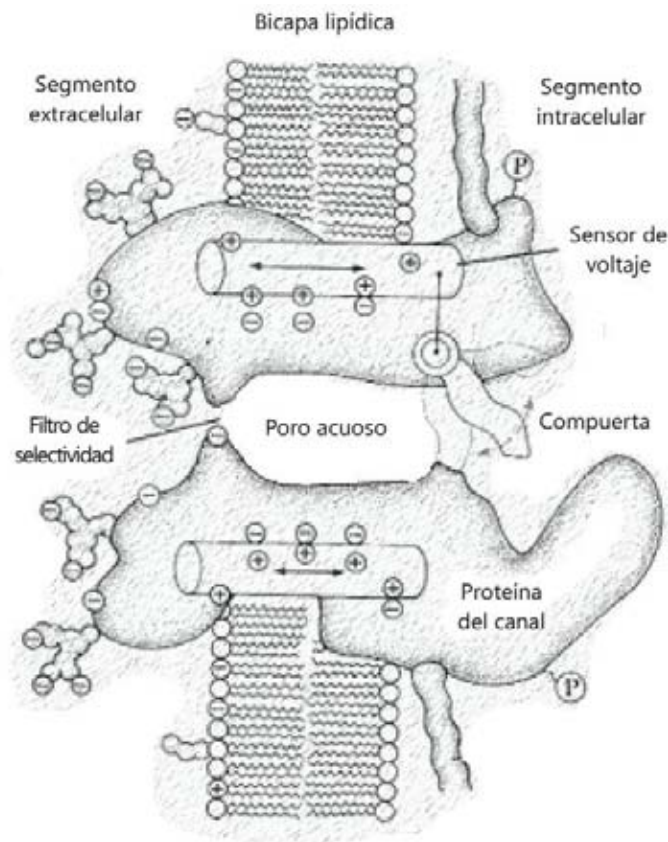


Figura 9. Estructura general de un canal iónico. Esta caricatura representa la estructura de un canal iónico, una macromolécula (proteína) inmersa en una bícapa lipídica. En términos generales los canales iónicos poseen: filtro de selectividad que determina la naturaleza química de las moléculas que podrán pasar a través de los canales, poro acuoso que corresponde a la estructura por donde fluyen los iones, compuerta de activación y en algunos casos, sensor de voltaje que determina la regulación de la actividad de los canales por cambios en el potencial de membrana (Modificado de Hille, 2001).

El modelo actualmente aceptado del mecanismo de permeabilidad de un ión a través de un canal se denomina "modelo del poro largo o de pasaje en fila india" (Figura 10) y describe la reducción de la movilidad efectiva de los iones los cuales fluyen uno a uno a través del poro a una velocidad constante (Hodgkin y Keynes, 1955; Hille, 2001; Portella *et al*, 2012).

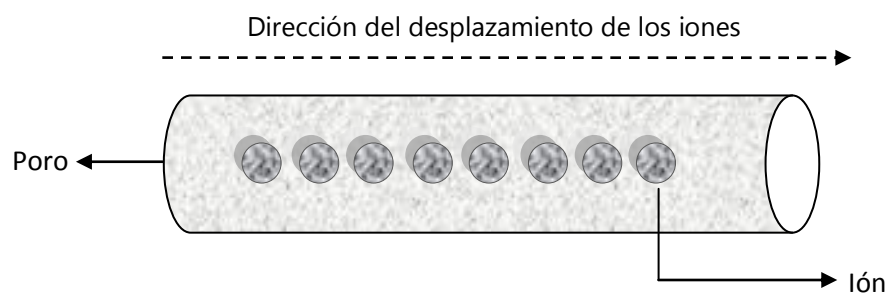


Figura 10. Modelo del poro largo o de pasaje en fila india. En este modelo se propone que el movimiento de un ión a través del poro de un canal provoca el desplazamiento de otro ión en la misma dirección de forma rápida y continua (Modificado de Hille, 2001).

A continuación describiré las características generales de los canales de K^+ , grupo al cual pertenece el canal Slo3 cuya relevancia fisiológica fue descrita previamente.

Canales de K⁺

Los canales de K⁺ intervienen en diversos procesos fisiológicos como la regulación del volumen celular, la detección de perturbación mecánica, la vasodilatación y la secreción de hormonas. Además, determinan la forma y duración del potencial de acción (Salkoff *et al*, 2006; González *et al*, 2012). La apertura de los canales de K⁺ estabiliza el potencial de membrana, razón por la cual el valor del potencial de reposo celular es muy cercano al del potencial de equilibrio del K⁺ (Hille, 2001).

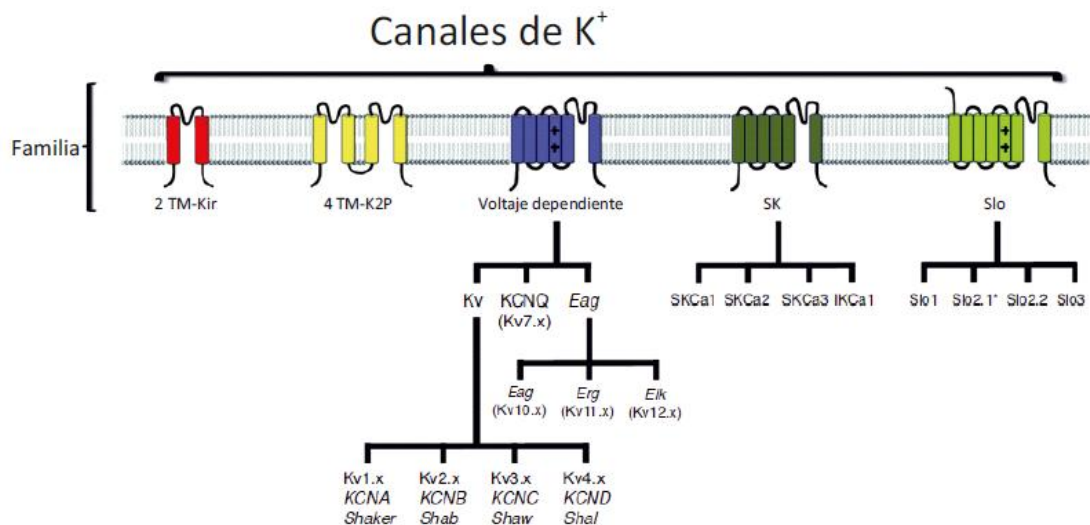


Figura 11. Clasificación de los canales de K⁺ de acuerdo al número de segmentos transmembranales. En el esquema se pueden observar las familias de canales de potasio (K⁺) distribuidas de acuerdo al número de segmentos transmembranales (TM) que poseen: 2TM-canales K_{ir}, 4TM-canales K_{2P}, 6TM-canales K_v y SK y 7TM-canales Slo (Modificado de González *et al*, 2012).

Los canales de K⁺ son un grupo muy heterogéneo que incluye moléculas estructuralmente diferentes. De acuerdo al número de segmentos transmembranales se clasifican en cinco familias (Figura 11), las cuales se describen a continuación:

- Canales de K⁺ rectificadores entrantes (K_{ir}): familia de canales que posee dos segmentos transmembranales, integrada por siete subfamilias K_{ir} 1-7.

Estos canales son modulados por fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), adenosín difosfato (ADP), adenosín trifosfato (ATP) y proteínas G (González *et al*, 2012), mientras que los iones cesio (Cs⁺) y bario (Ba²⁺) bloquean su actividad con una IC₅₀=3.5±1.1 mM y a 8.5±1.9 μM respectivamente (Kim *et al*, 2000).

En las células espermatozógenas (simplastos) se ha reportado la expresión del canal K_{ATP} el cual se inactiva con ATP y se bloquea con Ba²⁺ (IC₅₀=15.4 μM) (Muñoz *et al*, 2001; Acevedo *et al*, 2006).

- Canales de K⁺ de dos poros (K_{2p}): familia de canales con cuatro segmentos transmembranales, integrada por las subfamilias, TALK1-2, TASK1-5, THIK1-2, TRAAK, TREK1-2 y TWIK1-2 (O'Connell *et al*, 2002).

Estos canales son activados con zinc (Zn²⁺) (EC₅₀=87.1 μM) (Kim *et al*, 2005), riluzol (Duprat *et al*, 2000), ácido araquidónico (AA) (EC₅₀=30 μM) (Wells *et al*, 2012) y temperatura (24-42 °C) (Kang *et al*, 2005). La corriente de K⁺ que fluye por estos canales puede ser inhibida con bupivacaína (IC₅₀=95.4±14.6 μM), levobupivacaína (IC₅₀=126.1±24.5 μM), ropivacaína (IC₅₀=402.7±31.8 μM) (Shin *et al*, 2014), lidocaína (IC₅₀=180 μM) (Nayak *et al*, 2009), fluoxetina (IC₅₀=50 μM) (Kennard *et al*, 2005) y tetraetilamonio (TEA) (IC₅₀=0.15 mM) (Bushell *et al*, 2002).

No se ha reportado la expresión de canales K_{2p} en células espermatozógenas y/o espermatozoides, no obstante, se ha reportado que el canal TREK2 se expresa en testículo y es activado con pH ácido (pK_a=7.4) (Nöel *et al*, 2011).

- Canales de K^+ voltaje dependientes (K_v): familia de canales que posee seis segmentos transmembranales, S1-S6. Los segmentos S1-S4 constituyen el dominio del sensor de voltaje (VSD), el cual responde a cambios en el potencial de membrana. De este dominio destaca el S4, que posee cargas positivas conferidas por una secuencia de aminoácidos rica en argininas (R). Entretanto, el S5 y el S6 constituyen el dominio del poro (Blunk *et al*, 2012). Debido a la gran diversidad de esta familia, el estudio de los canales K_v permitió comprender características biofísicas de los canales de K^+ . No obstante, poco se sabía acerca de su estructura, fue entonces cuando en 1998 el grupo de MacKinnon publicó un artículo en el cual se cristalizó por primera vez un canal de K^+ , el canal *KcsA* (Figura 12), proveniente de la bacteria *Streptomyces lividans*. Demostrando así que la secuencia de aminoácidos glicina-tirosina-glicina (GYG) de la región del poro de los canales de K^+ está altamente conservada (Doyle *et al*, 1998).



Figura 12. Modelo de listones de la estructura del canal *KcsA*. En este modelo estructural del canal de K^+ , *KcsA*, se puede observar que los aminoácidos (aa) glicina-tirosina-glicina (GYG) constituyen el filtro de selectividad del poro del canal (Tomado de Doyle *et al*, 1998).

- Canales de K^+ de conductancia pequeña activados por Ca^{2+} (SK): al igual que los canales de la familia Kv poseen seis segmentos transmembranales, S1-S6. El poro se localiza entre el S5 y S6 y acoplado al S6 se encuentra el dominio de unión a Calmodulina (Figura 13). Estos canales poseen una conductancia de aproximadamente 10-14 pS y son activados por un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de 300-700 nmol/L (Strocker *et al*, 2004). Se clasifican en tres tipos: KCa2.1 (SKCa1), KCa2.2 (SKCa2) y KCa2.3 (SKCa3) los cuales son codificados por los genes *KCNN1*, *KCNN2* y *KCNN3* respectivamente (González *et al*, 2012).

Los miembros de esta familia se expresan preferentemente en células neuronales y están involucrados en la repolarización del potencial de acción. Estos canales son bloqueados con apamina, para el caso del SKCa1 se requiere una concentración de 0.7-12 nmol/L, el SKCa2 requiere de 27-140 pmol/L y el SKCa3 de 0.6-4 nmol/L (Weatherall *et al*, 2011).

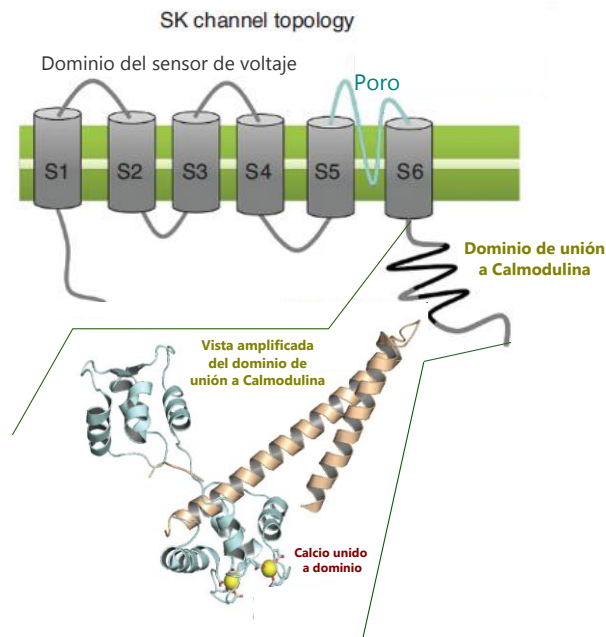


Figura 13. Topología general de los canales SK. Los canales de K^+ de la familia SK poseen seis segmentos transmembranales, un segmento amino terminal (NH_2) y un segmento carboxilo terminal ($-COOH$) ubicado en la región intracelular, un poro que se encuentra entre el segmento 5 y 6 (S5-S6) y un dominio de unión a Calmodulina en el extremo $-COOH$ (Modificado de González *et al*, 2012).

- Slo: Familia de canales de K^+ que posee siete o seis segmentos transmembranales, integrada por cuatro proteínas denominadas, Slo1, Slo2.1, Slo2.2 y Slo3 (Figura 14).

Se cree que este grupo evolucionó a partir de los canales K_v debido a la homología de su estructura, puesto que en ambas familias, el S4 corresponde al sensor de voltaje (Salkoff *et al*, 2006).

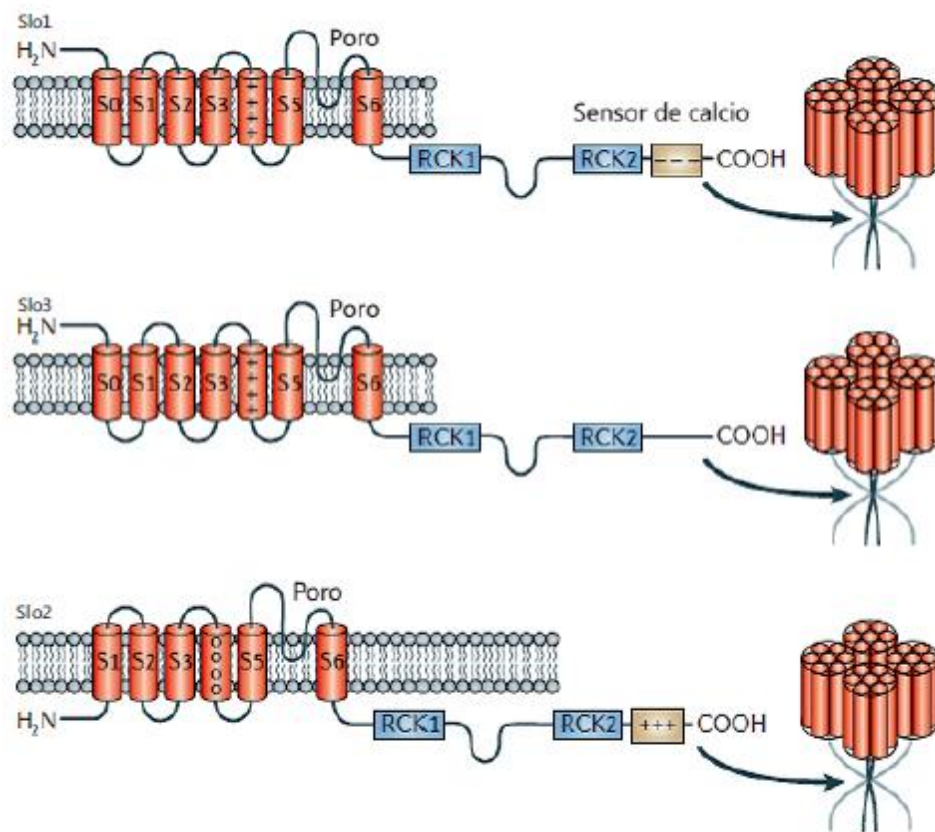


Figura 14. Topología de los canales de K^+ que integran a la familia Slo. Los canales de K^+ de la familia Slo poseen siete (Slo1 y Slo3) y seis (Slo2) segmentos transmembranales, un segmento amino terminal (NH_2) localizado en la región extracelular, un segmento carboxilo terminal (-COOH) ubicado en la región intracelular, un poro que se encuentra entre el segmento 5 y 6 (S5-S6), dos dominios reguladores de conductancia a potasio (RCK1 y RCK2) en el extremo -COOH y en el caso del Slo1, un sensor de Ca^{2+} acoplado al RCK2 (Modificado de Salkoff *et al*, 2006).

El objetivo general de este proyecto se centra en el estudio del canal Slo3, molécula que a continuación se describe.

Slo3

La proteína Slo3 es codificada por el gen *KCNU1* (González *et al*, 2012) y es un canal iónico que conduce K^+ . Fue clonado por primera vez en 1998 (Schreiber *et al*, 1998) y está constituido por un dominio amino terminal ubicado en la porción extracelular, un dominio carboxilo terminal inmerso en el citoplasma celular y siete segmentos transmembranales (S0-S6). En el segmento cuatro (S4) se encuentra el sensor de voltaje, el poro se localiza entre el S5 y S6 (Figura 15) y acoplado al S6 se hallan dos dominios reguladores de conductancia a potasio (RCK1 y RCK2) (Kirichok y Lishko, 2011).

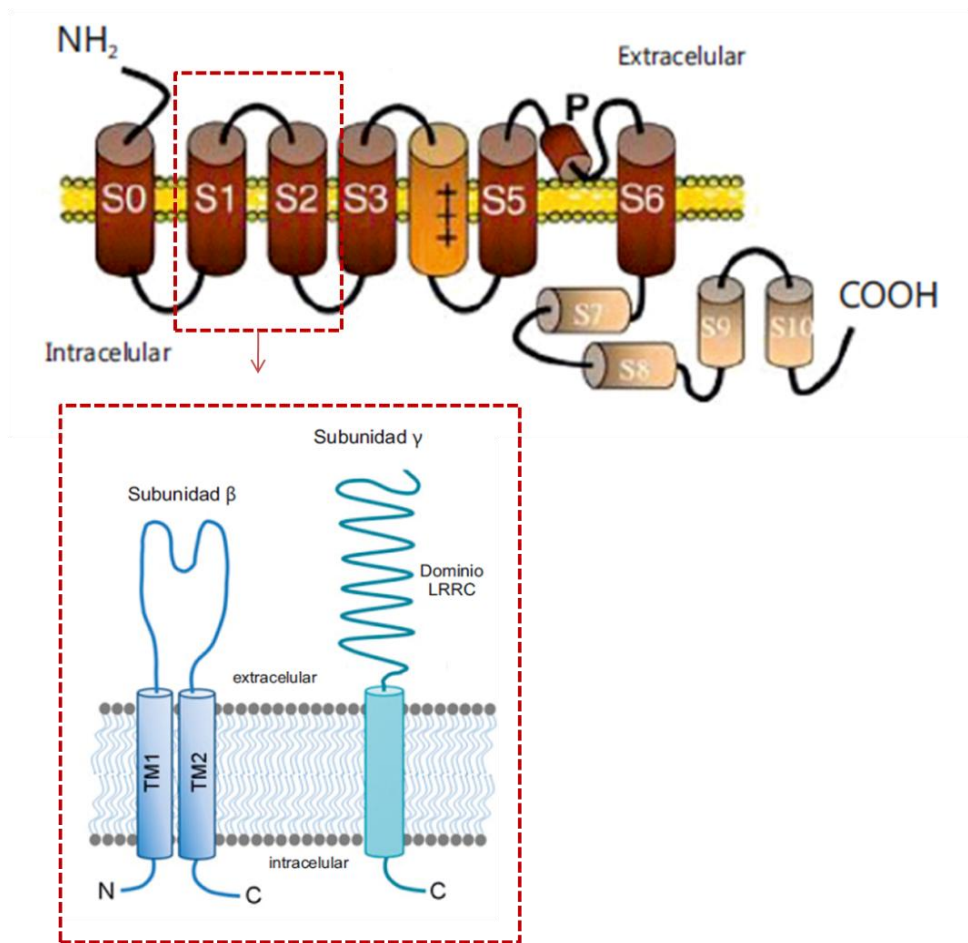


Figura 15. Topología del canal Slo3. En esta imagen se puede observar la topología del canal Slo3, entre el S6 y S5 se localiza el poro, en el S4 se encuentra el sensor de voltaje y entre el S1 y S2 se localizan dos subunidades accesorias (β y γ), cuya relevancia se describe más adelante (Modificado de Lishko *et al*, 2012 y de González *et al*, 2014).

Este canal es dependiente de voltaje, se activa con PIP₂ (Tang *et al*, 2010) y con pHi alcalino (Figura 16) (Leonetti *et al*, 2012). Se ha demostrado que la subunidad accesoria y "leucine-rich-repeat-containing 52" (Figura 15) juega un papel importante en la activación de la corriente a pHi alcalino y a potenciales depolarizantes, favoreciendo la conductancia del canal a potenciales de membrana fisiológicos. Además, la subunidad accesoria β (β4) (Figura 15) co-expresada en ovocitos de *Xenopus laevis* incrementa la magnitud de la corriente de potasio del canal Slo3 (I_{KSlo3}) (Yang *et al*, 2009).

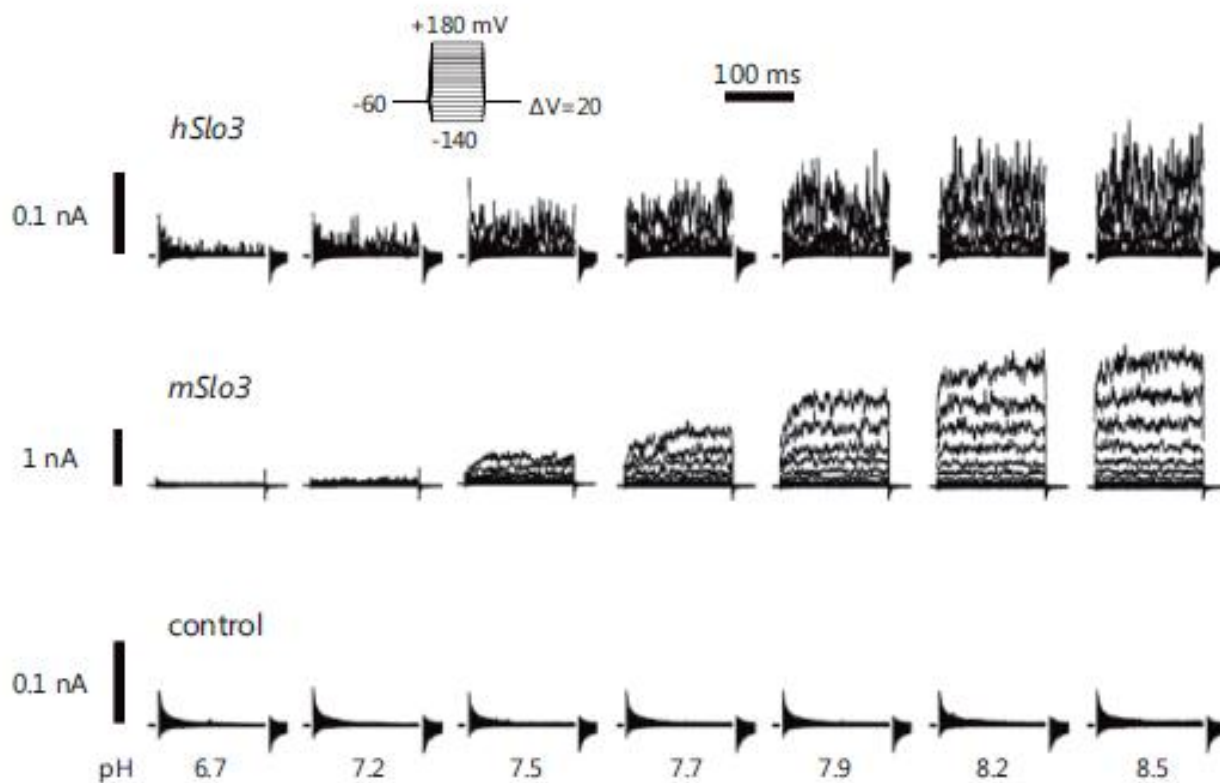


Figura 16. Activación de la corriente de K⁺ de los canales *hSlo3* y *mSlo3* mediante la alcalinización del pHi. En los registros de corriente de los canales *hSlo3* y *mSlo3* expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* se puede notar un incremento gradual en la magnitud de la corriente al alcalinizar el pHi respecto al control (ovocitos inyectados con agua). Este incremento es más evidente a potenciales depolarizantes y en términos generales es mayor para el caso del canal *mSlo3* (Modificado de Leonetti *et al*, 2012).

El *mSlo3* (canal Slo3 de ratón) expresado heterológicamente en ovocitos de *Xenopus* es resistente al bloqueo extracelular con TEA (Tang *et al*, 2010) y sensible al bloqueo intra- y extra-celular con quinidina a concentraciones superiores a 10 μM . Por otro lado, la corriente del canal Slo3 registrada en espermatozoides epididimales (Figura 17) es susceptible al bloqueo con 50 μM de clofilium (agente antiarrítmico que de acuerdo a la clasificación de Vaughan Williams pertenece a la clase III, es decir, afecta la salida de K^+ y bloquea este tipo de canales, Anexo 2), concentración con la cual se inhibe aproximadamente el 92% de la corriente que fluye por este canal (Navarro *et al*, 2007; Zeng *et al*, 2011).

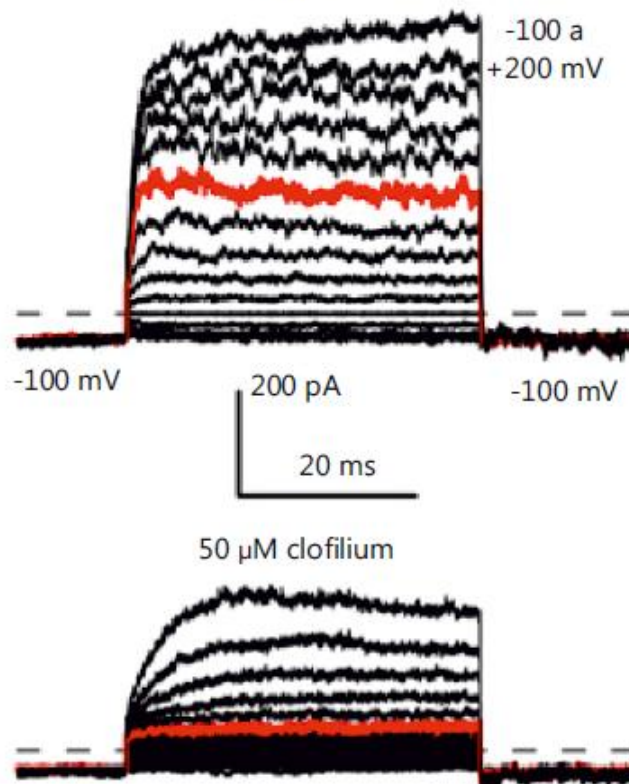


Figura 17. Bloqueo con 50 μM de clofilium de la corriente de K^+ del canal Slo3 (I_{KSlo3}) registrada en espermatozoides epididimales de ratón. En esta figura se puede apreciar que posterior a la adición de 50 μM de clofilium se da un bloqueo de más del 50% de la corriente (la línea punteada representa el potencial de sostenimiento=0 mV) (Modificado de Zeng *et al*, 2011).

La corriente macroscópica del canal Slo3 de ratón y de humano es rectificante saliente (el canal conduce preferentemente iones K^+ hacia fuera de la célula), y la conductancia registrada en canal unitario (que corresponde a la cantidad de corriente que conduce un solo canal a un valor de voltaje determinado en un gradiente de concentración específico) es de aproximadamente 90 picosiemens (pS), a diferencia de la conductancia registrada en el canal Slo1, la cual oscila entre los 230-270 pS (Contreras *et al*, 2013).

Esta proteína se expresa específicamente en los testículos y espermatozoides de diferentes especies de mamífero, entre las cuales hay una baja conservación en la secuencia de aa y posee características específicas de acuerdo a la especie (Santi *et al*, 2009).

El canal Slo3 determina el potencial de reposo y la hiperpolarización de los espermatozoides de ratón. Además, está involucrado en el éxito de la fertilización, ya que los ratones Slo3^{-/-} son infértiles (Santi *et al* 2010, Zeng *et al*, 2011) y los espermatozoides provenientes de estos ratones presentan defectos como disminución en la velocidad de nado, formación de horquillas en el flagelo y decremento en el porcentaje de reacción acrosomal (Santi *et al*, 2010).

Fijación de área de membrana “patch-clamp”

Como se mencionó previamente, para comprender la intervención de los canales iónicos en la fertilización se ha recurrido a la técnica de fijación de área de membrana “patch-clamp” la cual fue desarrollada en 1976 por los alemanes Erwin Neher y Bert Sakmann (Hamill, *et al* 1981), quienes quince años después, en 1991 recibieron el premio Nobel en medicina por la creación de esta valiosa herramienta aplicada al estudio de los canales iónicos, ya que permite medir el flujo iónico a través de canales a partir del aislamiento de un microdominio de membrana con un microelectrodo. El estudio de canales iónicos con la técnica de fijación de área de membrana proporciona ventajas notables sobre los métodos ópticos:

- a. Permite medir la actividad directa de los canales iónicos en tiempo real.
- b. Proporciona una resolución temporal mayor a un milisegundo (ms).
- c. Permite un control preciso de las condiciones que afectan la actividad de los canales iónicos por ejemplo: el potencial de membrana, el cual en la configuración fijación de voltaje “voltage-clamp” permanece fijo, al igual que la composición de las soluciones iónicas al interior y exterior de la membrana celular.
- d. Permite realizar estudios de farmacología funcional directamente sobre la actividad de los canales.
- e. Permite evaluar la función a nivel de un solo canal (canal unitario), determinando así la relación estructura-función y las propiedades biofísicas del mismo.

Para realizar mediciones del flujo iónico mediante la técnica de fijación de área de membrana se emplea una micropipeta fabricada a partir de capilares de vidrio. Dentro de esta micropipeta se localiza un electrodo de plata (Figura 18. Anexo 2) revestido con cloruro de plata (AgCl) inmerso en una solución electro-conductora (solución salina de pipeta) con una composición iónica conocida. La micropipeta se posiciona en la superficie de la membrana celular con la ayuda de un micromanipulador y posteriormente se aplica una ligera succión mecánica con la finalidad de incrementar la resistencia eléctrica (la cual está dada en megaOhms, $M\Omega$) producida entre la punta de la pipeta y la membrana de la célula, estableciéndose así lo que comúnmente se denomina giga-sello (que corresponde a un sello de alta resistencia en el orden de los gigaOhms, $G\Omega$). Una vez obtenido el giga-sello el experimentador efectúa las maniobras que lo conduzcan a obtener la configuración de registro deseada (Figura 19).

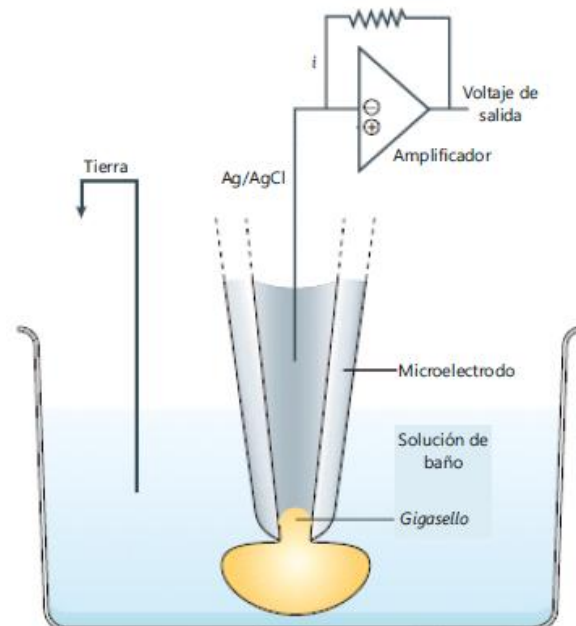


Figura 18. Diagrama de sistema de registro de fijación de área de membrana.
(Modificado de Dunlop *et al*, 2008).

Existen diferentes configuraciones de registro de la técnica de fijación de áreas de membrana. En términos generales estas configuraciones varían respecto a la integridad y orientación de la membrana celular, así como a la continuidad eléctrica entre la célula y la pipeta (Kornreich, 2007).

- Célula unida "On-cell": constituye únicamente el contacto mecánico entre la punta de la pipeta de registro con una pequeña sección de la superficie de la membrana celular y permite registrar la actividad iónica de un solo canal (registro de corriente de canal unitario) o de un conjunto de canales dependiendo del área de membrana que cubra la punta de la pipeta y la densidad de canales por unidad de área que haya en la membrana celular.
- Célula completa "Whole-cell": mediante esta configuración se pueden registrar las corrientes iónicas que fluyen a través de los canales localizados en toda la membrana celular, tanto en condiciones control como en presencia de sustancias agonistas o antagonistas.
- Lado interno de la membrana hacia afuera "Inside-out": disposición en la cual la cara de la membrana citoplasmática está expuesta a la solución del baño. Esta configuración es útil cuando se pretende investigar la actividad de canales iónicos regulados por ligandos intracelulares (Cahalan y Neher, 1992).
- Lado externo de la membrana hacia afuera "Outside-out": mediante esta configuración la membrana celular externa está expuesta a la solución del baño, por lo que es posible estudiar dominios extracelulares de un solo canal regulados por neurotransmisores o agonistas (Lippiat y Wrighton, 2013).

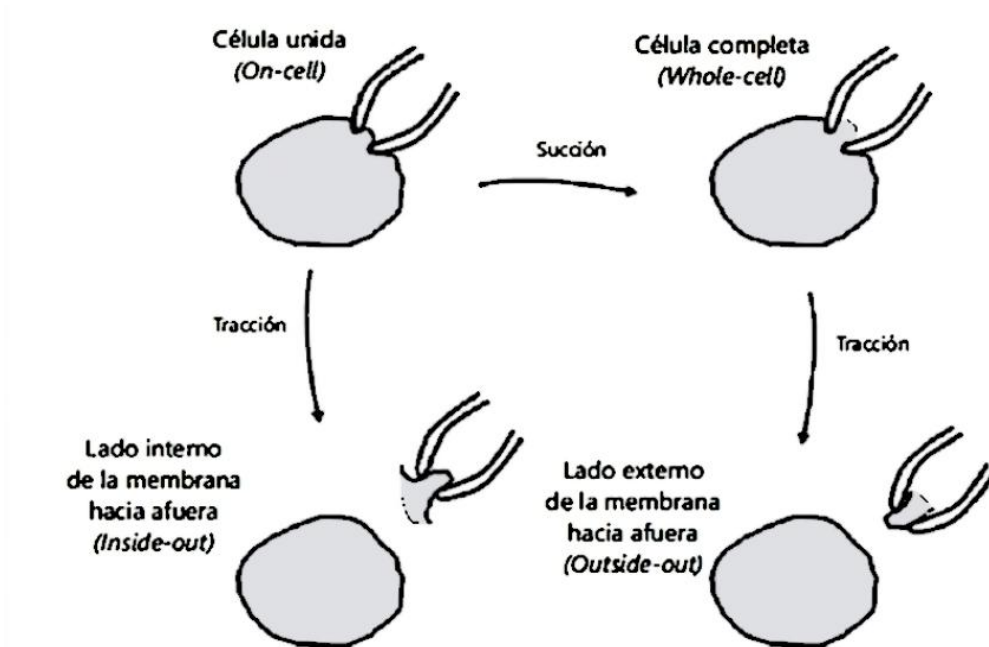


Figura 19. Configuraciones de registro de la técnica de fijación de área de membrana. En esta figura se muestran cuatro tipos diferentes de configuraciones para el registro de corriente iónica que pudiese fluir a través de uno o varios canales las características puntuales de cada configuración están mencionadas en el texto (Modificado de Brüggemann, 2008).

En los últimos años se han desarrollado diferentes variaciones de la técnica de fijación de área de membrana convencional como la fijación de área de membrana acoplada a la fluorimetría “patch-clamp-fluorometry” y la fijación de área de membrana automatizada “automated patch-clamp”.

La fijación de área de membrana acoplada a la fluorimetría fue desarrollada hace catorce años, esta técnica combina herramientas empleadas en espectroscopia y electrofisiología para detectar simultáneamente cambios conformacionales que generan transiciones entre diferentes estados de un canal iónico (abierto, cerrado o desensibilizado) y el flujo de corriente a través de canales inmersos en la membrana celular (Zheng y Zagotta, 2000; Kusch y Zifarelli, 2014).

A pesar de que la fijación de área de membrana convencional es considerada la “prueba de oro” (Yajuan *et al*, 2012) para el estudio de los canales iónicos, el procedimiento experimental suele ser complicado e implica un tiempo considerable. Ante tal panorama se han desarrollado múltiples sistemas de fijación de área de membrana automatizada, los cuales permiten disminuir el tiempo invertido en los experimentos efectuados con fijación de área de membrana convencional (Brüggeman *et al*, 2008).

Los primeros trabajos encaminados a la automatización de la fijación de área de membrana, datan de 1990 con la invención del Neuropatch®, el cual inicialmente no se comercializó (Dunlop *et al*, 2008). La fijación de área de membrana automatizada suele ser utilizada para elucidar la interacción entre una droga con un canal iónico específico; es ampliamente difundida en ensayos farmacológicos del tipo fármaco-receptor, sin embargo, la mayoría de los sistemas de fijación de área de membrana automatizada únicamente admiten la configuración fijación de voltaje-célula completa. En algunos la calidad de los datos se ve superada por el número producido (Yajuan *et al*, 2012) y, hasta el momento, no se ha logrado aplicar este tipo de sistemas en células pequeñas y móviles como lo son los espermatozoides.

Una solución a este último punto es la que se propone justamente con el desarrollo de este trabajo empleando un tipo celular precursor del espermatozoide que posea al canal Slo3 nativo con las mismas propiedades biofísicas y farmacológicas del canal Slo3 presente en el espermatozoide maduro.

Justificación

Mediante diferentes técnicas se ha detectado la presencia del canal Slo3 en espermatozoides. Ésta proteína ha sido caracterizada electrofisiológicamente debido a las implicaciones fisiológicas en las que interviene, ya que su ausencia en ratones Slo3^{-/-} produce infertilidad. Sin embargo, aún no se ha demostrado ni caracterizado funcionalmente la presencia del canal Slo3 en estadios previos de maduración del espermatozoide, como son las células espermatogénicas; las cuales, al ser células nativas representan un excelente modelo de estudio de este canal. Esta característica aunada a su tamaño (mayor que el del espermatozoide) permitirá realizar investigación farmacológica mediante fijación de área de membrana automatizada.

Hipótesis

El canal Slo3 está presente en células espermatogénicas de ratón y tiene las mismas características electrofisiológicas y farmacológicas que el estudiado en espermatozoides epididimales, por lo tanto estas células pueden constituir un buen modelo para el estudio funcional de este canal.

Objetivo general

- Caracterizar electrofisiológica y farmacológicamente al canal Slo3 en células espermatozógenas de ratón.

Objetivos particulares

- Caracterizar el efecto del pHi sobre el canal Slo3 mediante registros de fijación de voltaje en células espermatozógenas de ratones silvestres (Slo3^{+/+}) y nulos (Slo3^{-/-}).
- Caracterizar las propiedades farmacológicas del canal Slo3 en sellos de alta resistencia en ausencia y presencia de clofilium.

Material y métodos

Soluciones para el registro de corriente iónica del canal Slo3

Para registrar la corriente de K^+ se utilizó una solución de pipeta que contenía lo siguiente en mM: KOH 135, KCl 5, $CaCl_2$ 1.8, EGTA 10, glucosa 5, HEPES 10 y pH ajustado a 6, 6.8 y 8 con $MetSO_4$. Así como una solución de baño que contenía lo siguiente en mM: KOH 135, KCl 5, $CaCl_2$ 1.8, glucosa 40, HEPES 10 y pH ajustado a 7.4 con $MetSO_4$. Estas soluciones se filtraron con un sistema de filtración al vacío MILLIPORE Express™ PLUS (Merck, Darmstadt, Alemania) proveído con una membrana con un diámetro del poro de 0.22 μm . Ambas soluciones se elaboraron con reactivos de grado analítico de las compañías Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) y JT Baker, Avantor Performance Material, Inc (Center Valley, PA, EUA) y se almacenaron a 4 °C hasta el día de su uso.

Los valores de osmolaridad de las soluciones se midieron por triplicado con el osmómetro VAPRO® 5520 (WESCOR, Utah, EUA) obteniéndose así los siguientes valores:

- Solución de pipeta: 287 mOsm.
- Solución de baño: 290 mOsm.

La concentración final de Ca^{2+} libre contenido en la solución de pipeta se calculó con el software *MAXCHELATOR* (<http://maxchelator.stanford.edu/CaEGTA-NIST.htm>), registrándose el valor de 10 nM.

Obtención de células espermatogénicas redondas de ratón

Las células espermatogénicas redondas se obtuvieron de ratones de la cepa CD1 (Charles River Laboratories International, Inc, EUA) de tres meses de edad así como de ratones nulos ($Slo3^{-/-}$) de la cepa C57BL/6 (The Jackson Laboratory, EUA) criados en el área experimental del bioterio de barrera y contención del Instituto de Biotecnología, UNAM con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, alimentados con pellet 2018SX (Harlan Laboratories, Inc, EUA) y agua ozonizada.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se diseccionó un testículo, el cual se colocó en una solución salina cuya composición en mM fue la siguiente: NaCl 135, KCl 5, $CaCl_2$ 1.8, $MgSO_4$ 1, ácido láctico 10, piruvato de sodio 1, glucosa 5, HEPES 20 y pH ajustado a 7.4 con NaOH. Posteriormente, se cortó la túnica albugínea y el testículo se disoció de forma mecánica separando los túbulos seminíferos con pinzas de disección bajo un microscopio estereoscópico SZ-ST (OLYMPUS, Japón) con un sistema de iluminación externo 180 (Dolan-Jenner Industries, Inc, Boxborough, MA, EUA).

Por último, las células espermatogénicas se obtuvieron al cortar los túbulos seminíferos y resuspender la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico, estas células se mantuvieron a 4°C y se usaron el mismo día de la extracción.

Técnica de registro de corriente iónica: fijación de área de membrana

Se utilizó la técnica de fijación de área de membrana en la configuración de fijación de voltaje en célula completa (ver sección de Fijación de área de membrana en introducción) para registrar la corriente de potasio (I_K) de células espermatozógenas redondas.

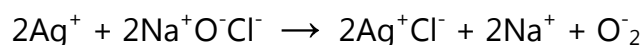
Las micropipetas utilizadas en este trabajo se forjaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato de 0.8-1.1 x 100 mm (Kimble® Chase, Vineland, NJ, EUA) para lo cual se empleó el estirador de capilares Micropipette Puller P-2000 (Sutter Instruments, EUA) y se diseñó un protocolo de dos ciclos con los siguientes parámetros:

Ciclo 1	Temperatura=720	Filamento=4	Velocidad=28	Tiempo=0	Tracción=0
Ciclo 2	Temperatura=820	Filamento=4	Velocidad=28	Tiempo=0	Tracción=0

Al término de ambos ciclos se obtuvieron micropipetas con resistencia de 2-4 M Ω las cuales se pulieron con calor utilizando la microforja MF-83 (Narishige Scientific Instrument Lab, Tokio, Japón) para disminuir el diámetro de la punta y aumentar la resistencia de 2-4 a un rango final de 6-9 M Ω .

Preparación de electrodos de AgCl

Para la elaboración de electrodos de Ag revestidos con AgCl con base a la reacción de oxidación:



Se llevó a cabo lo descrito a continuación:

Se cortaron dos alambres de Ag pura AG15W (Warner Instruments, A Harvard Apparatus, Company, Holliston, MA, EUA) de 0.375 mm de diámetro y ~3 cm de largo, los cuales se sumergieron durante toda la noche en una solución de hipoclorito de sodio. A la mañana siguiente ambos alambres se lavaron con agua destilada, se secaron y finalmente un alambre (electrodo de registro) se unió a los conectores metálicos HB180 (Dagan Corporation, Minneapolis, Minnesota, EUA) del cabezal CV201 o CV202AU del amplificador AXOPATCH 200 o 200A (Axon Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), el otro alambre se soldó al conector metálico de la tierra del cabezal CV201 o CV202AU (electrodo de referencia) y la unión alambre-conector se recubrió con un tubo aislante termo-ajustable Thermofit (Stereon®, México, DF).

Registros electrofisiológicos en células espermatozógenas redondas

Se adicionó 1 mL de la preparación de células espermatozógenas redondas en una cámara de registro de polimetilmetacrilato (Plexiglas®, Warner Inst. EUA) con forma de diamante montada sobre un cubreobjetos de vidrio de 24x40-1 Fisherfinest Premium Cover Glass (Fisher Scientific, EUA) unido a este con grasa de vacío (Vacuum Grease Silicone, Beckman Coulter Inc. Brea, CA, EUA) y atornillada al redondel del microscopio invertido Eclipse 2000 o Eclipse TE2000-U (Nikon Co, Japón).

El posicionamiento de la micropipeta sobre la célula se llevó a cabo con el micromanipulador piezoeléctrico Burleigh PCS-5300 (Thor labs, INC, EUA) o con el micromanipulador motorizado MP-225 (Sutter, EUA).

Todos los registros se hicieron con los amplificadores AXOPATCH 200 o 200A (Axon Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) conectados a una PC (con sistema operativo MS-DOS o Windows 98) mediante la interfaz analógica-digital Digidata 1200 (Axon Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) con una frecuencia de muestreo de 20 KHz (Anexo 3).

La resistencia de acceso al efectuar la transición de la configuración de célula unida a célula completa fue de 22-38 M Ω , los transitorios capacitivos generados por el cierre del circuito eléctrico entre la pipeta y la membrana de la célula se compensaron electrónicamente y la estimulación con pulsos de voltaje se llevó a cabo con el programa Clampex versión 6 o 9 (Axon Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Las curvas corriente-voltaje (I-V) se construyeron a partir de la generación de pulsos de voltaje de 250 ms de duración, partiendo de un potencial de sostenimiento de 0 mV a pulsos de prueba de -100 a +110 y de -100 a +130 mV con incrementos de +10 mV ($\Delta V=10$ mV). Estos protocolos de estimulación de la corriente del canal Slo3 se aplicaron antes (control) y después de la adición manual de 40 mM de NH₄Cl (condición experimental I) y de 50 μ M de clofilium (condición experimental II).

Análisis de datos

Los resultados derivados de este proyecto fueron analizados con los programas Clampfit versiones 10.3 y 4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) para el análisis de registros de corriente iónica, Sigma Plot versión 10.0 para la creación de gráficas y Origin versión 6.0 (Microcal Software, Northampton, MA, EUA) para el análisis estadístico.

Las curvas corriente voltaje (I-V) se construyeron al graficar la corriente normalizada respecto a la capacitancia celular (carga por unidad de área) (Ecuación 1) para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

$$C=Q / E \dots \text{Ecuación 1}$$

Donde:

C, capacitancia; Q, carga y E, potencial de membrana

La gráfica conductancia voltaje (G-V) se construyó a partir de los valores de corriente convertidos en conductancia para lo cual se despejó la conductancia de la ley de Ohm como se muestra a continuación:

$$I_K=g_K (E_m-E_K) \dots \text{Ecuación 2}$$

$$g_K=I_K / (E_m-E_K) \dots \text{Ecuación 3}$$

Donde:

g_K , conductancia de K^+ ; I_K , corriente de K^+ y E_m-E_K , diferencia de potencial entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del ión K^+

Una vez obtenidos los valores de conductancia a partir de la ecuación 3, estos se normalizaron respecto a la conductancia máxima (G/Gmax), observándose así una distribución sigmoïdal de los datos, razón por la cual, el ajuste de estos valores se llevó a cabo con la ecuación 4.

$$\frac{P_2}{P_1} = \exp \frac{(-\mu_2 - \mu_1)}{\kappa T} \quad \dots \text{Ecuación 4}$$

Donde:

P₁, pendiente 1; P₂, pendiente 2; μ₂-μ₁, diferencia entre el estado de energía 2 y el estado de energía 1; κ, constante de Boltzmann; T, temperatura en °K

Análisis estadístico

La prueba estadística aplicada a los resultados fue la *t-student* pareada debido a que permite evaluar el promedio de dos condiciones experimentales efectuadas en la misma célula.

Resultados

La I_K registrada en células espermatoogénicas redondas de ratón silvestre, es activada por la alcalinización del pHi, así como, por pulsos de voltaje depolarizantes

En los registros representativos de la Figura 20 efectuados con el protocolo de estimulación que se observa en el panel a) (el cual genera pulsos de voltaje de 250 ms de duración, partiendo de un potencial de sostenimiento de 0 mV con pulsos de prueba de -100 a +130 mV), se puede apreciar que en la condición experimental I, es decir, al fijar el pHi a 6.8 y posteriormente alcalinizarlo con la adición manual de 40 mM de NH_4Cl ; la magnitud de la corriente rectificante saliente (registrada en células espermatoogénicas redondas de ratón silvestre) incrementa a valores cercanos a los de la corriente registrada en el control de la estrategia experimental II, es decir, al fijar el pHi a 8.

Este incremento en la magnitud de la corriente se da a potenciales depolarizantes, como se puede apreciar en la curva I-V del panel a) de la Figura 21. En la que además, se puede notar que el potencial reverso es igual a cero. Por lo tanto, la corriente registrada corresponde a I_K dado que en la solución de baño y de pipeta se utilizó una concentración simétrica de K^+ . El aumento en la densidad de la corriente es estadísticamente significativo a pHi 6.8, 6.8 + 40 mM NH_4Cl y 8 respecto a pHi 6 a +130 mV, como se puede ver en el panel b) de la Figura 21.

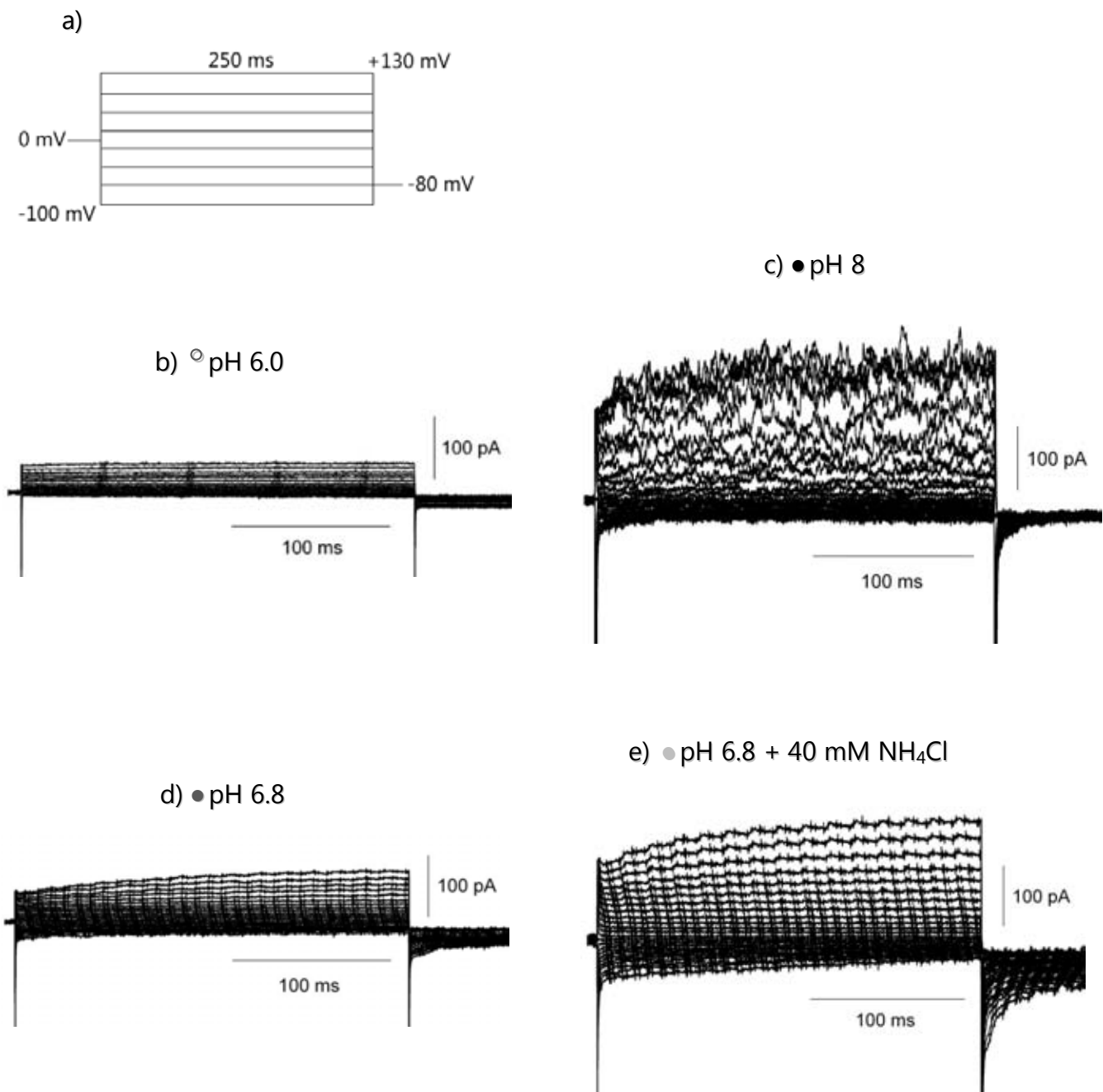


Figura 20. La corriente registrada en células espermatogénicas de ratón silvestre ($Slo3^{+/+}$) es rectificante saliente y se activa al alcalinizar el pH. En a) protocolo de estimulación. De b)-e) trazos representativos de la corriente registrada con el pH de la solución de pipeta ajustado a 6, 8, 6.8 y 6.8 + 40 mM NH_4Cl respectivamente.

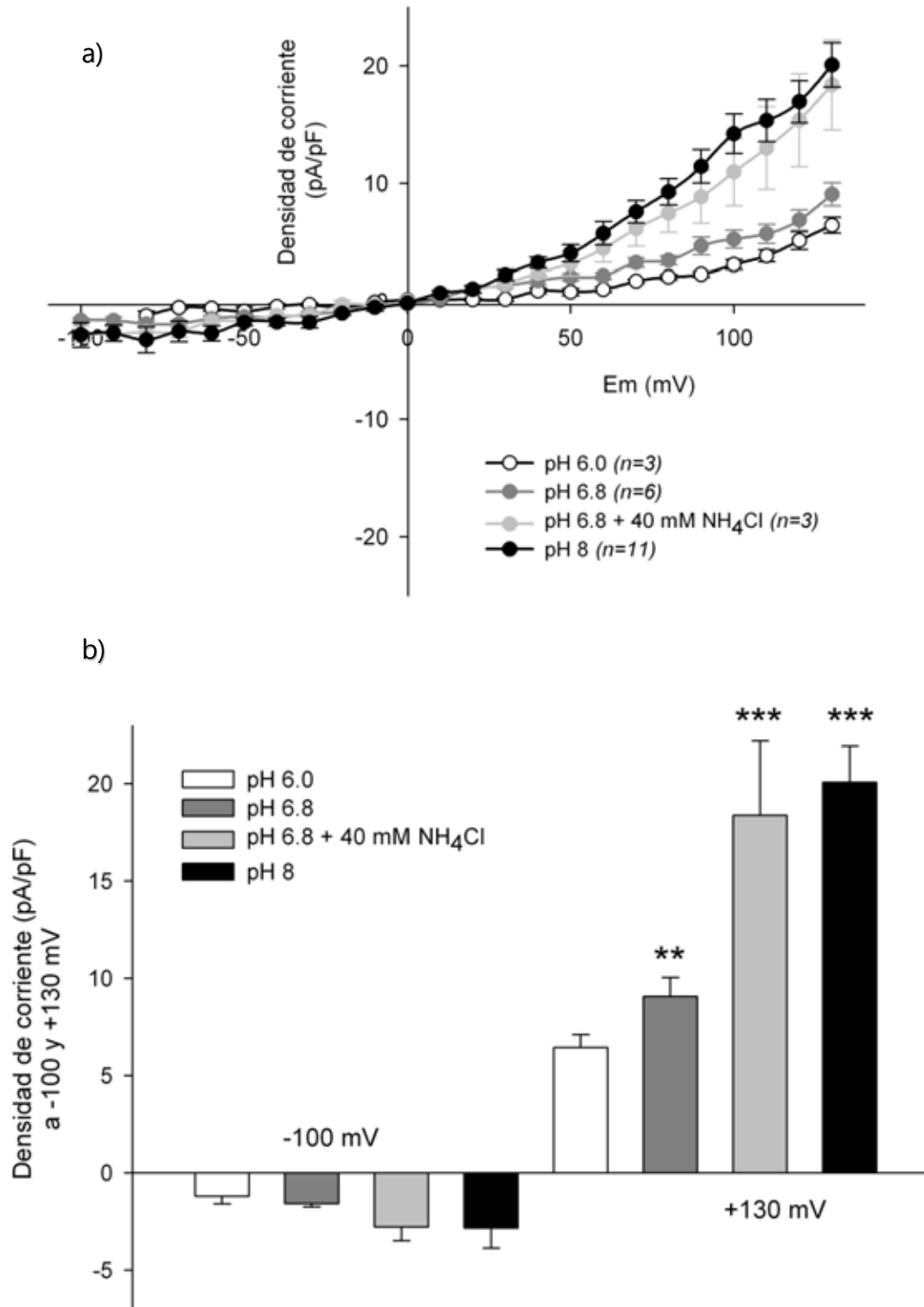


Figura 21. La I_K registrada en células espermatozógenas de ratón silvestre es dependiente del pH y del voltaje. En a) curva I-V con la corriente normalizada respecto a la capacitancia. En b) gráfica de barras de la densidad de corriente registrada a -100 y a +130 mV (*media \pm error estándar y diferencia significativa respecto a pH 6 ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0001$ con prueba t-Student*).

Para corroborar la voltaje dependencia de la I_k registrada con el pH ajustado a 6.8, 8 y 6.8 + 40 mM NH_4Cl , se realizó una curva G-V (Figura 22), en la cual, se puede observar que los valores de conductancia de las tres condiciones siguen una distribución sigmoïdal de acuerdo al ajuste hecho con la ecuación de Boltzmann.

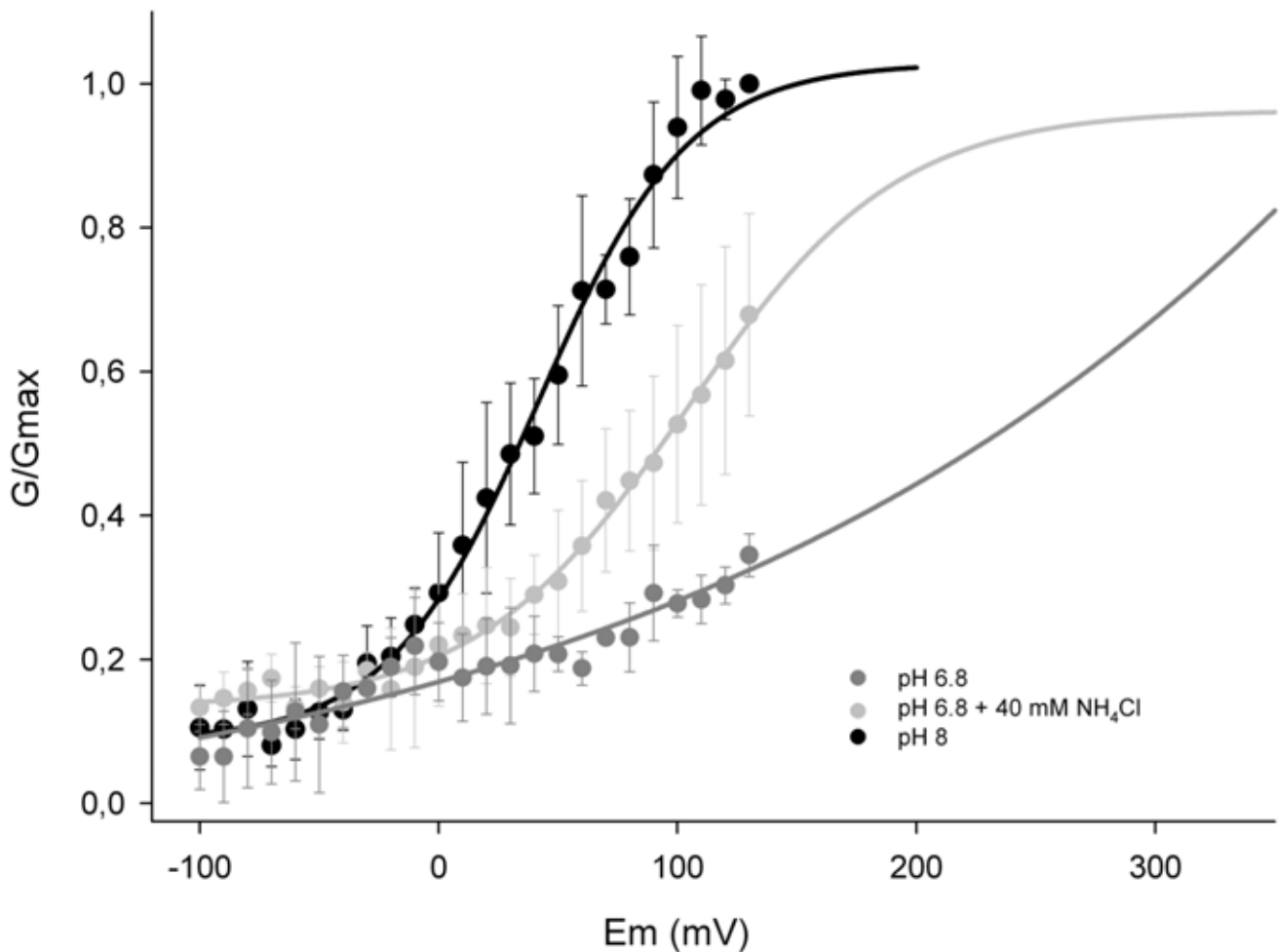


Figura 22. La I_k registrada en células espermatogénicas de ratón silvestre es voltaje dependiente.

La I_K registrada en células espermatoogénicas redondas de ratón silvestre es bloqueada con 50 μM de clofilium

Actualmente no se conoce un bloqueador específico para el canal Slo3, no obstante, el canal Slo3 registrado en espermatozoides epididimales de ratón es susceptible al bloqueo con 50 μM de clofilium (Anexo 3), concentración con la cual se inhibe aproximadamente el 92% de la corriente que fluye por este canal (Navarro *et al*, 2007; Zeng *et al*, 2011).

Ante tal evidencia, se llevó a cabo la condición experimental II, es decir, se efectuaron registros de I_K en células espermatoogénicas redondas de ratón con el pH ajustado a 8 más la adición manual de 50 μM de clofilium. En estos registros se puede notar que posterior a la adición de clofilium hay una disminución en la magnitud de la corriente de aproximadamente el 35% (Figura 23).

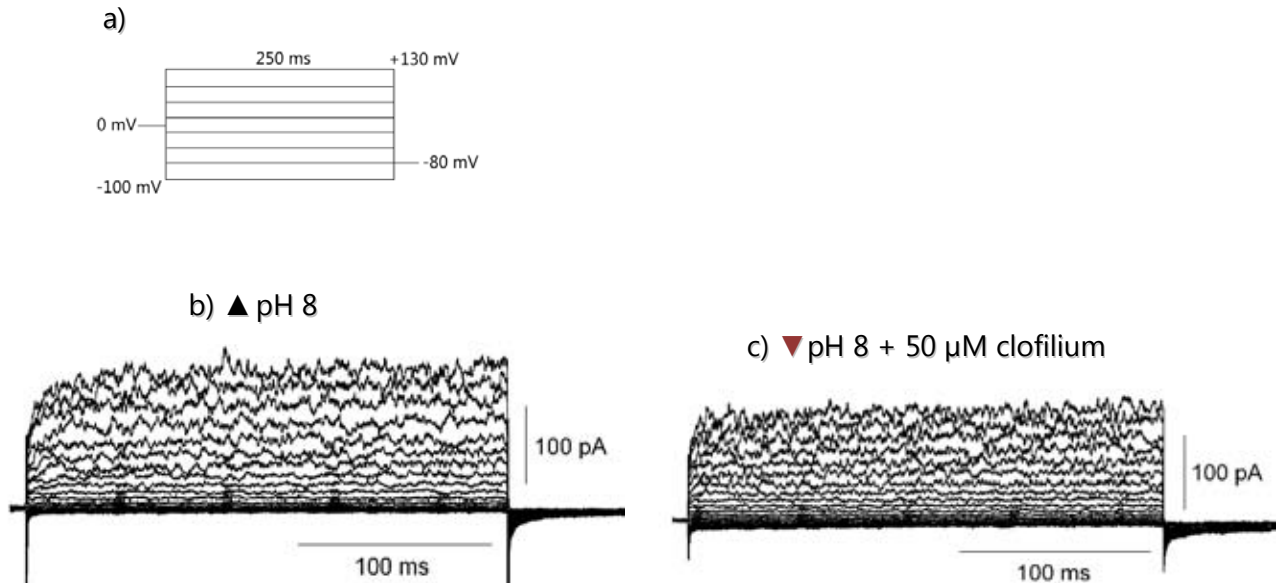


Figura 23. La I_K registrada en células espermatoogénicas redondas de ratón silvestre es bloqueada con clofilium. En a) protocolo de estimulación. En b) y c) registro representativo de I_K con el pH de la solución de pipeta ajustado a 8, antes y después de la adición de 50 μM de clofilium, respectivamente.

Tal disminución se hace más evidente al efectuar la curva I-V (Panel a) Figura 24), en el cual se puede observar que a potenciales depolarizantes desde aproximadamente +70 mV se da bloqueo de la I_K , el cual es estadísticamente significativo a +130 mV (Panel b) Figura 24).

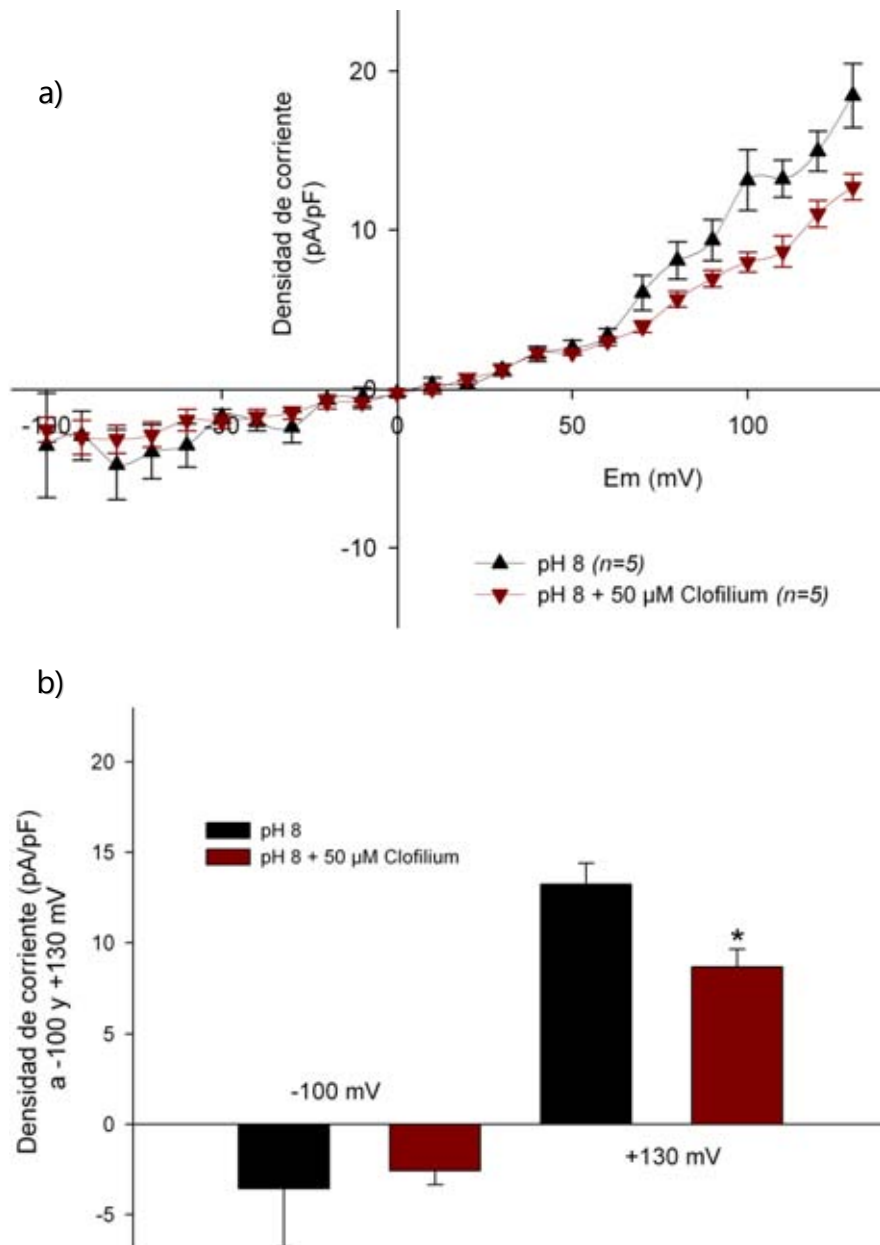


Figura 24. La I_K registrada en células espermatogénicas redondas de ratón silvestre es bloqueada con clofilium únicamente a potenciales depolarizantes. En a) curva I-V con la corriente normalizada respecto a la capacitancia. En b) gráfica de barras de la densidad de corriente registrada a -100 y +130 mV (*media \pm error estándar y diferencia significativa respecto a pH_i 6 * $P < 0.01$ con prueba t-Student*).

La I_K registrada en células espermatoogénicas redondas de ratón nulo a Slo3 ($Slo3^{-/-}$) no se activa al alcalinizar el pHi

En estudios previos se ha registrado I_K en espermatozoides de ratones nulos a Slo3 ($Slo3^{-/-}$) y nulos a Slo3 y a CatSper1 ($Slo3^{-/-}CatSper1^{-/-}$), en ambos casos la activación de la corriente no es dependiente de pH (Santi *et al*, 2010; Zeng *et al*, 2013).

Considerando estos antecedentes se efectuaron registros electrofisiológicos en células espermatoogénicas de ratones $Slo3^{-/-}$ de acuerdo a la condición experimental I. En estos registros se puede observar una cinética rápida e incremento en la magnitud de la corriente posterior a la alcalinización del pHi con 40 mM de NH_4Cl (Paneles b) y c) Figura 25), respecto a la corriente registrada en células del mismo estadio celular provenientes de ratones silvestres (Paneles d) y e) Figura 25).

Por otro lado, en la curva I-V (Panel a) Figura 26) se puede apreciar que la magnitud de la corriente registrada a pHi 6.8 y a pHi 6.8 + 40 mM de NH_4Cl en células espermatoogénicas de ratones $Slo3^{-/-}$ es similar a la de la corriente registrada en células espermatoogénicas de ratones $Slo3^{+/+}$ a pHi 6.8. No obstante, al comparar la magnitud de la corriente registrada a pHi 6.8 + 40 mM de NH_4Cl en células espermatoogénicas de ratón $Slo3^{+/+}$ y de ratón $Slo3^{-/-}$ no existe una diferencia significativa (Panel b) Figura 26). Además el potencial reverso de la corriente registrada en todas las condiciones es igual a cero, lo que sugiere que se trata de una I_K .

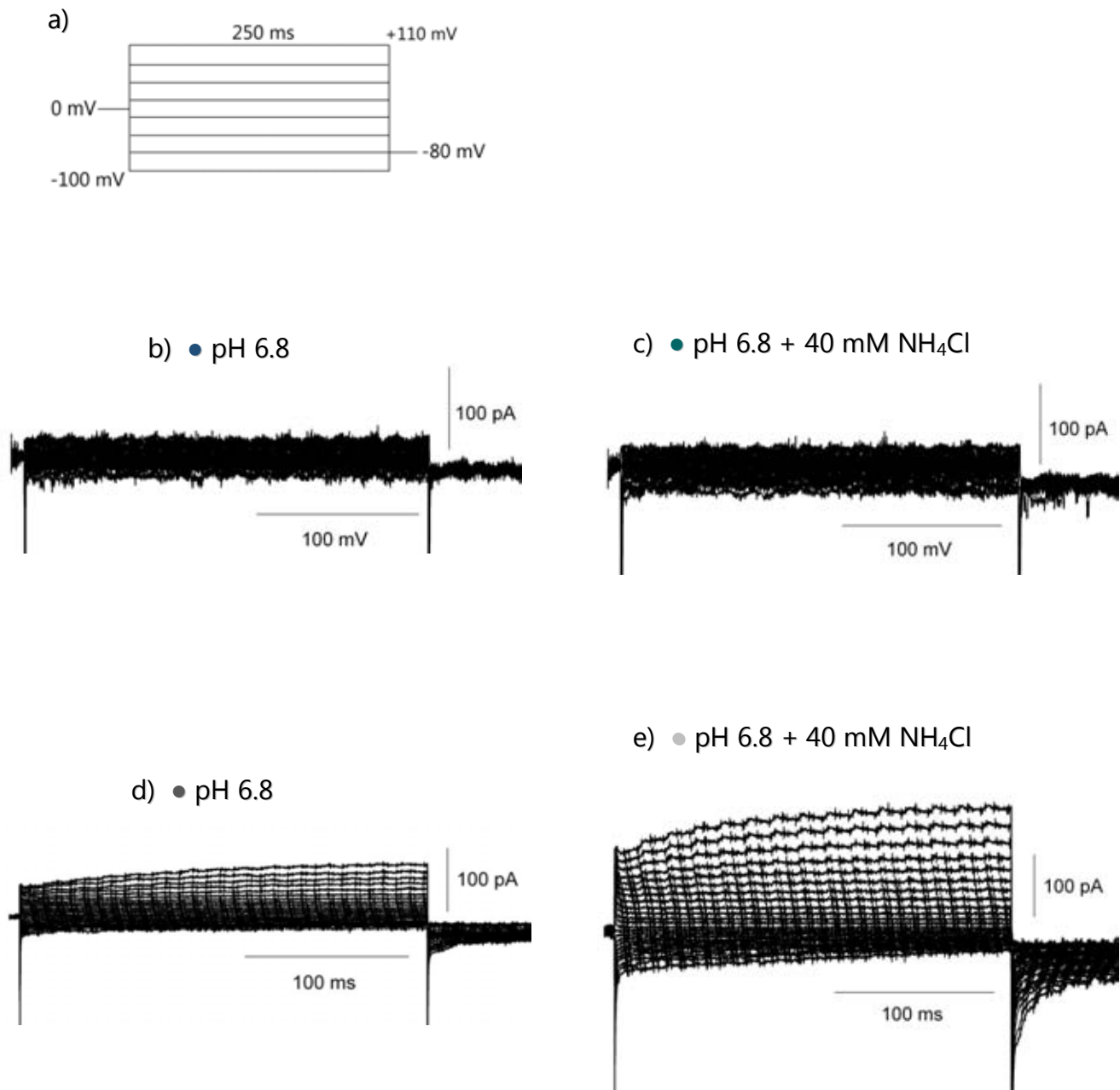


Figura 25. La activación de la corriente registrada en células espermatogénicas de ratón Slo3^{-/-} no es dependiente del pH. En a) protocolo de estimulación. En b) y c) trazo representativo de la corriente registrada en células espermatogénicas de ratón Slo3^{-/-} con el pH ajustado a 6.8 y 6.8 + 40 mM NH₄Cl respectivamente. En d) y e) trazo representativo de la corriente registrada en células espermatogénicas de ratón Slo3^{+/+} con el pH ajustado a 6.8 y 6.8 + 40 mM NH₄Cl, respectivamente.

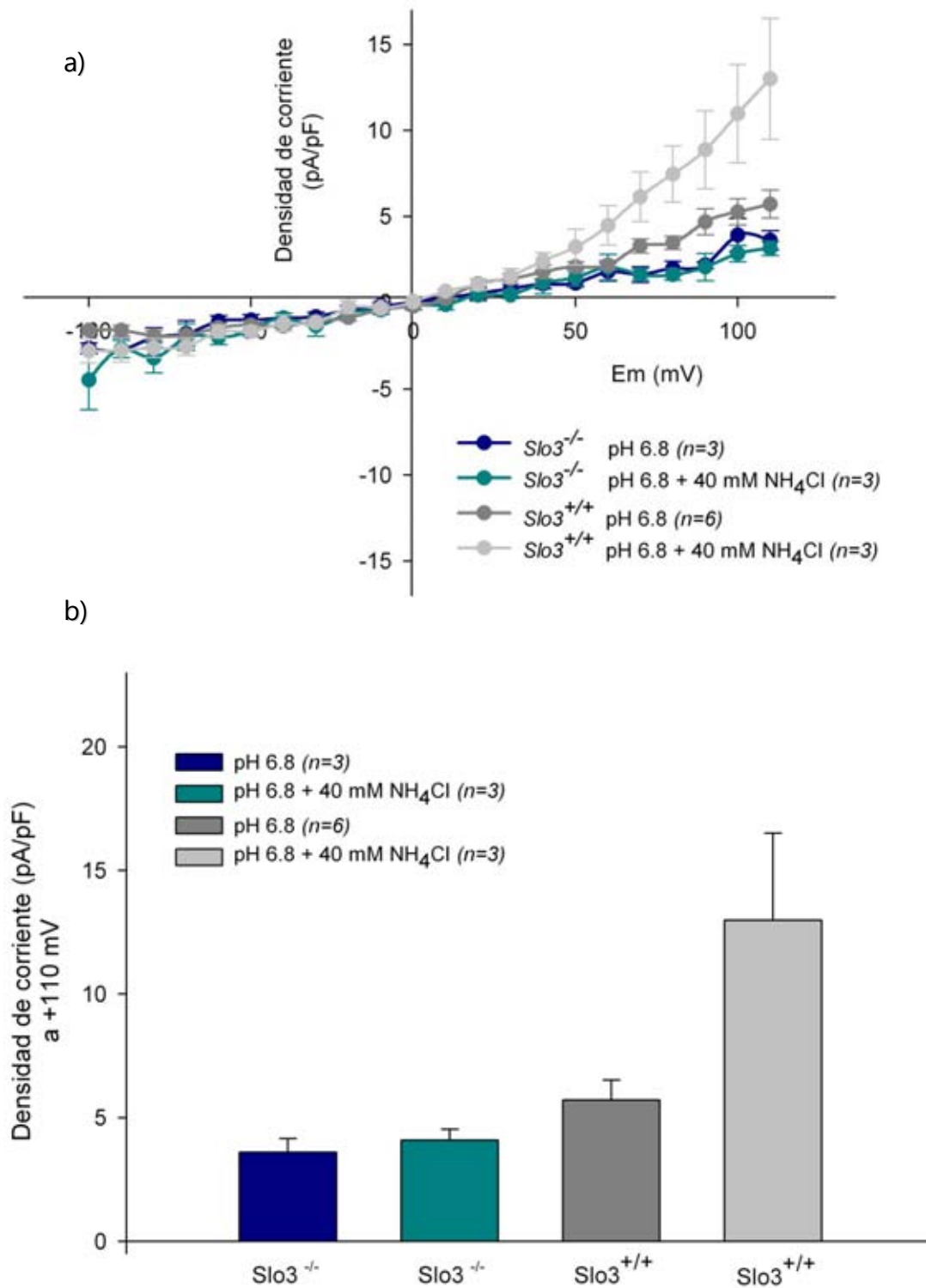


Figura 26. La activación de la I_K registrada en células espermatogénicas de ratón $Slo3^{-/-}$ no es dependiente del pH_i . En a) curva I-V con la corriente normalizada respecto a la capacitancia. En b) gráfica de barras de la densidad de corriente registrada a +110 mV (*media \pm error estándar*).

El canal Slo3 se expresa en el 60% de las células espermatogénicas redondas registradas

Al contabilizar el número total de células espermatogénicas registradas y al considerar la evidencia generada a partir de los resultados previamente mostrados en las Figuras 20, 23 y 25 se realizó una gráfica del porcentaje de células registradas, en la cual, se puede observar que el canal Slo3 se expresa en el 60% de estas células (Figura 27).

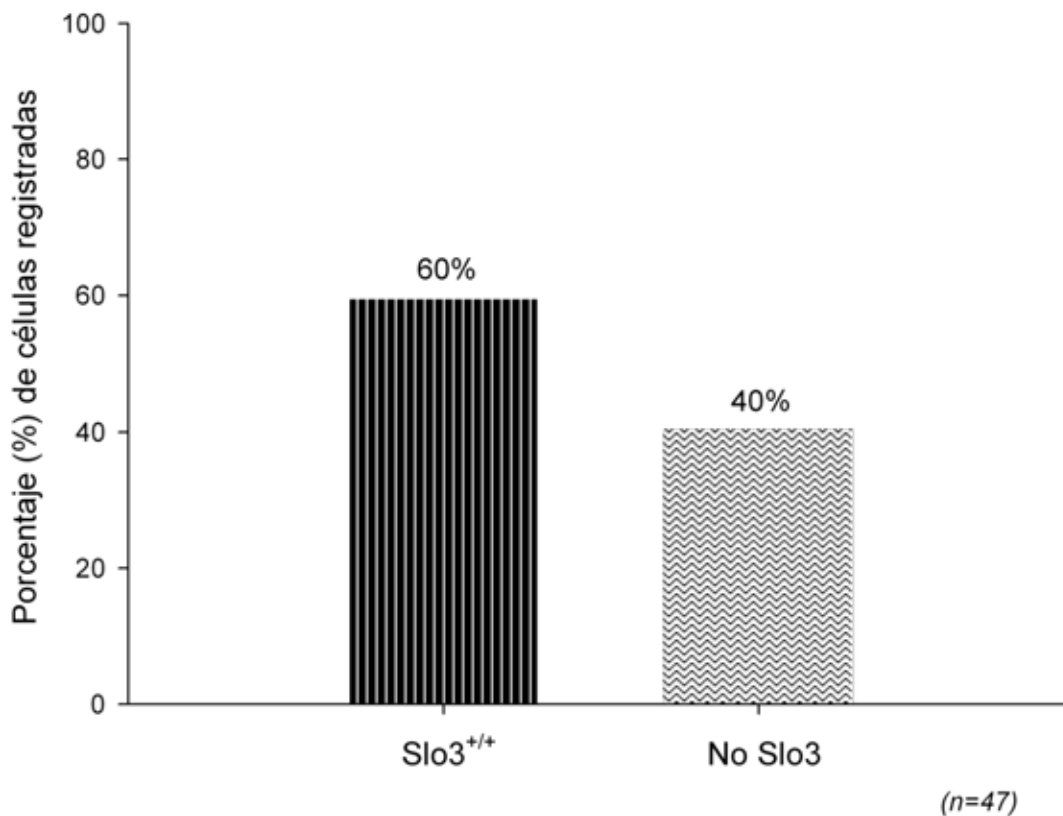


Figura 27. Gráfica de barras del porcentaje total de células espermatogénicas registradas.

Discusión

Se ha demostrado que el canal de K^+ Slo3 se expresa específicamente en células testiculares y espermatozoides de diferentes especies de mamífero, entre las cuales hay una baja conservación en la secuencia de aminoácidos y poseen características específicas de acuerdo a la especie (Santi *et al*, 2009).

No obstante, hasta el momento no se ha explorado la actividad de este canal en células espermatogénicas de mamífero, las cuales debido a su tamaño $\sim 6 \mu\text{m}$ de diámetro (Mays *et al*, 1995) podrían facilitar la obtención de registros electrofisiológicos y ser utilizadas para investigar las propiedades biofísicas y farmacológicas de este canal.

Ante este contexto, en este proyecto se propuso caracterizar electrofisiológicamente la presencia del canal Slo3 en células espermatogénicas de ratón y, adicionalmente, nos planteamos caracterizar las propiedades farmacológicas de este canal en sellos de alta resistencia en ausencia y presencia de clofilium.

Debido a que el bloqueo de la I_K rectificante saliente registrada en células espermatogénicas se da únicamente a potenciales depolarizantes, cabe la posibilidad de que el clofilium inhiba otra conductancia de K^+ como la del canal Slo1, el cual recientemente se registró en espermatozoides de humano (Mannowetz *et al*, 2013), suscitando así una controversia respecto al origen de la I_K atribuido anteriormente al canal Slo3 (Santi *et al*, 2009; Yang *et al*, 2009; Santi *et al*, 2010; Tang *et al*, 2010; Zeng *et al*, 2011; Lishko *et al*, 2012; Yang *et al*, 2011; Leonetti *et al*, 2012; Chávez *et al*, 2013; Zheng *et al*, 2013), esta evidencia más la reportada en un trabajo recientemente

publicado en el cual se propone que el canal Slo3 de humano transporta Ca^{2+} (Brenker *et al*, 2014) han llevado a este y a otros grupos a proponer que la I_k rectificante saliente registrada en espermatozoides de humano proviene de un canal heterotetrámero Slo3/Slo1 formado a partir de "splicing" alternativo.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el canal Slo3 se expresa en el 60% de las células espermatogénicas registradas de ratones silvestres y está ausente en las de ratones Slo3^{-/-}. La corriente de K^+ del canal Slo3 se activa a potenciales depolarizantes, a pH alcalino y se bloquea con clofilium a potenciales depolarizantes (de +70 a +130 mV).

Estos hallazgos sugieren que las células espermatogénicas, al ser células nativas y de mayor tamaño que el espermatozoide representan un excelente modelo de estudio del canal Slo3, esta característica aunada a su tamaño permitirá realizar investigación farmacológica mediante la técnica de fijación de área de membrana automatizada "patch-clamp" automatizado.

Conclusiones

- En este trabajo se caracterizó mediante registros de fijación de voltaje en células espermatogénicas de ratones silvestres ($Slo3^{+/+}$) y nulos ($Slo3^{-/-}$) el efecto del pH_i sobre una I_K saliente, la cual presenta las mismas características de activación por voltaje y alcalinización del pH_i que la I_{KSlo3} registrada en espermatozoides epididimales de la misma especie.
- Aunado a esto, se determinaron en sellos de alta resistencia en ausencia y presencia de clofilium las propiedades farmacológicas de la I_K previamente referida, la cual presenta un porcentaje de bloqueo del 30% a potenciales depolarizantes.
- Los datos generados en este trabajo sugieren que el canal Slo3 tiene una tasa de expresión del 60% en células espermatogénicas de ratón.

Perspectiva

Realizar investigación farmacológica mediante la técnica de fijación de área de membrana automatizada "patch-clamp" automatizado en células espermatogénicas redondas de ratón para determinar posibles bloqueadores del canal Slo3 esencial en la fertilidad de murinos y posiblemente de humanos. De encontrarse algún bloqueador que inhiba más del 96% de la corriente, este podría ser considerado bloqueador específico del canal Slo3 con potencial para desarrollar una alternativa como anticonceptivo masculino no hormonal.

Referencias

- Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, de la Vega-Beltrán JL, Treviño CL, Felix R, Darszon A. 2006. KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Dev Biol* 289(2):395–405.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 4(4):581 -96.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 12(5):323-30.
- Bellvé AR. 1998. Introduction: the male germ cell; origin, migration, proliferation and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 9(4):379-91.
- Blunck R, Batulan Z. 2012. Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol* 3:166.
- Brenker C, Zhou Y, Müller A, Echeverry FA, Trötschel C, Poetsch A, Xia XM, Bönigk W, Lingle CJ, Kaupp UB, Strünker T. 2014. The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife* 3:e01438, 1-19.
- Brüggemann A, Farre C, Haarmann C, Haythornthwaite A, KreirM, Stoelzle S, George M, Fertig N. 2008. Planar patch clamp: advances in electrophysiology. *Methods Mol Biol* 491:165-76.
- Buffone MG, Hirohashi N, Gerton GL. 2014. Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol. Reprod* 90(5):112, 1-8.
- Bushell T, Clarke C, Mathie A, Robertson B. 2002. Pharmacological characterization of a non-inactivating outward current observed in mouse cerebellar Purkinje neurones. *Br J Pharmacol* 2:705–712.
- Cahalan M, Neher E. 1992. Patch clamp techniques: an overview. *Methods Enzymol* 207:3-14.
- Cayetano J. 1992. Introducción al estudio del espermatozoide. Argentina. Ediciones Hector Macchi 2-33.
- Chang MC. 1984. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168 (4277):697-8.
- Chávez JC, de la Vega-Beltrán JL, Escoffier J, Visconti PE, Treviño CL, Darszon A, Salkoff L, Santi CM. 2013. Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization. *PLoS One* 8(4):e60578.
- Chung J-J, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. 2011. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* 2:153, 1-23.

- Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52(1):198-236.
- Contreras GF, Castillo K, Enrique N, Carrasquel-Ursulaez W, Castillo JP, Milesi V, Neely A, Alvarez O, Ferreira G, González C, Latorre R. 2013. A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. *Channels (Austin)* 7(6):442-458.
- Cummins JM, Woodall PF. 1985. On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil* 75(1):153-75.
- Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131(6):977-88.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 79(2):481-510.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol. Rev* 91(4):1305-55.
- DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. 1993. Ca (2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 99(1):135-43.
- Doyle D. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280(5360):69-77.
- Dunlop J, Bowlby M, Peri R, Vasilyev D, Arias R. 2008. High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat Rev Drug Discov* 7(4):358-68.
- Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, Lazdunski M. 2000. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K (+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* 57(5):906-12.
- Fraser LR. 1992. Ca (2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 99(1):135-43.
- Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J. 2010. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science* 329(5988):216-9.
- González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, Latorre R. 2012. K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol* 2(3):2087-149.
- Gonzalez-Perez V, Xia X-M, Lingle CJ. 2014. Functional regulation of BK potassium channels by γ 1 auxiliary subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci* 111(13):4868-73.

- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391(2):85-100.
- Hille B. 2001. Ionic channels of excitable membranes. *Sinauer* 291-300.
- Hodgkin AL, Keynes RD. 1955. The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J Physiol* 128(1):61-88.
- Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. 2011. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci* 108(50):20008-11.
- Jaiswal D, Singh V, Dwivendi US, Trivedi S, Singh K. 2014. Chromosome microarray analysis: a case report of infertile brothers with CATSPER gene deletion. *Gene* 542 (2):263-5.
- Kang D, Choe C, Kim D. 2005. Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* 564:103–16.
- Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, Armstrong SJ, Veale EL, Mathie A. 2005. Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br J Pharmacol* 144(6):821–9.
- Kim J, Park J, Kang H, Lee E, Bang H, Lee J. 2005. Zinc activates TREK-2 potassium channel activity. *J Pharmacol Exp Ther* 314(2):618–625.
- Kim SJ1, Kerst G, Schreiber R, Pavenstädt H, Greger R, Hug MJ, Bleich M. 2000. Inwardly rectifying K⁺ channels in the basolateral membrane of rat pancreatic acini. *J Physiol* 441(2-3):331–340.
- Kirichok Y, Lishko P V. 2011. Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod* 17(8):478-99.
- Knobil E, Neill J. 1993. The physiology of reproduction. *Raven Press* 29-77.
- Kornreich BG. 2007. The patch clamp technique: principles and technical considerations. *J Vet Cardiol* 9(1):25-37.
- Kusch J, Zifarelli G. 2014. Patch-clamp fluorometry: electrophysiology meets fluorescence. *Biophys. J* 106(6):1250-7.
- Lagarrigue M, Becker M, Lavigne R, Deininger SO, Walch A, Aubry F, Suckau D, Pineau C. 2011. Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20-microm resolution. *Mol Cell Proteomics* 10 (3):1-11.
- Leonetti MD, Yuan P, Hsiung Y, Mackinnon R. 2012. Functional and structural analysis of the human SLO3 pH- and voltage-gated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci* 109(47):19274-9.
- Lippiat JD, Wrighton DC. 2013. Conventional micropipette-based patch clamp techniques. *Methods Mol Biol* 998:91-107.

- Lishko P V, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J-J, Clapham DE. 2012. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol* 74:453-75.
- Mallowitz N, Naidoo NM, Choo S-AS, Smith JF, Lishko P V. 2013. Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *eLife* 2:1-19.
- Marín-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Gonzalez-Echeverría F, Blaquier JA, Miranda PV, Tezón JG. 2003. Effect of antisperm antibodies present in human follicular fluid upon the acrosome reaction and sperm-zona pellucida interaction. *Am J Reprod Immunol* 50(3):209-19.
- Mays-Hoopers LL, Bolen J, Riggs AD, Singer-Sam J. 1995. Preparation of spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence-activated cell sorting. *Biol Reprod* 53(5):1003-11.
- Morgan DJ, Weisenhaus M, Shum S, Su T, Zheng R, Zhang C, Shokat KM, Hille B, Babcock DF, McKnight GS. 2008. Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proc Natl Acad Sci* 105(52):20740-5.
- Muñoz-Garay C, De la Vega-Beltrán JL, Delgado R, Labarca P, Felix R, Darszon A. 2001. Inwardly rectifying K (+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol* 234(1):261-74.
- Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. 2007. KSper a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proc Natl Acad Sci* 104(18):7688-92.
- Nayak TK, Harinath S, Nama S, Somasundaram K, Sikdar SK. 2009. Inhibition of human two-pore domain K⁺ channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics. *Mol Pharmacol* 76(4):903-917.
- Nishigaki T, González AL, Orta GJ. 2013. CatSper in male infertility. *EUA. Springer-Verlag* 717-728.
- Noël J, Sandoz G, Lesage F. 2011. Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* (5):402-9.
- O'Connell AD, Morton MJ, Hunter M. 2002. Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* 1566(1-2):152-61.
- Portella G, Polupanow T, Zocher F, Boytsov DA, Pohl P, Diederichsen U, de Groot BL. 2012. Design of peptide-membrane interactions to modulate single-file water transport through modified gramicidin channels. *Biophys J* 103(8):1698-705.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE. 2007. All four CatSper ion

- channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci* 104(4):1219-23.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413(6856):603-9.
 - Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65:245-59.
 - Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosc* 7(12):921-31.
 - Santi CM, Butler A, Kuhn J, Wei A, Salkoff L. 2009. Bovine and mouse SLO3 K⁺ channels: evolutionary divergence points to an RCK1 region of critical function. *J Biol Chem* 284(32):21589-98.
 - Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL. 2010. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* 584(5):1041-6.
 - Schreiber M, Wei A, Yuan A, Gaut J, Saito M, Salkoff L. 1998. Slo3 a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *J Biol Chem* 273(6):3509-3516.
 - Shin HW, Soh JS, Kim HZ, Hong J, Woo DH, Heo JY, Hwang EM, Park JY, Lee CJ. 2014. The inhibitory effects of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on K2P (two-pore domain potassium) channel TREK-1. *J Anesth* 28(1):81-6.
 - Smith JF, Syritysyna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y, Lishko PV. 2013. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci* 110(17):6823-8.
 - Stocker M, Hirzel K, D'hoedt D, Pedarzani P. 2004. Matching molecules to function: neuronal Ca²⁺-activated K⁺ channels and after hyperpolarizations. *Toxin* 43(8): 933-49.
 - Tang Q, Zhang Z, Xia X, Lingle CJ. 2010. Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine. *Channels (Austin)* 4(1):22-41.
 - Tang QY, Zhang Z, Xia J, Ren D, Logothetis DE. 2010. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate activates Slo3 currents and its hydrolysis underlies the epidermal growth factor-induced current inhibition. *J Biol Chem* 285(25):19259-66.
 - Vadnais ML, Lin AM, Gerton GL. 2014. Mitochondrial fusion protein MFN2 interacts with the mitostatin-related protein MNS1 required for mouse sperm flagellar structure and function. *Cilia* 3:5.

- Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 13(3):395-405.
- Visconti PE. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci* 106(52):667-668.
- Weatherall KL, Seutin V, Liégeois JF, Marrion NV. 2011. Crucial role of a shared extracellular loop in apamin sensitivity and maintenance of pore shape of small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels. *Proc Natl Acad Sci* 108(45): 18494-9.
- Wells GD1, Tang QY, Heler R, Tompkins-MacDonald GJ, Pritchard EN, Leys SP, Logothetis DE, Boland LM. 2012. A unique alkaline pH-regulated and fatty acid-activated tandem pore domain potassium channel (K₂P) from a marine sponge. *J Exp Biol* 215:2435–44.
- Yajuan X, Xin L, Zhiyuan L. 2012. A comparison of the performance and application differences between manual and automated patch-clamp techniques. *Curr Chem Genomics* 6:87-92.
- Yanagimachi R.1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2(4):371-2.
- Yang C, Zeng X-H, Zhou Y, Xia X-M, Lingle CJ. 2011. LRRC52 (leucine-rich-repeat-containing protein 52), a testis-specific auxiliary subunit of the alkalization-activated Slo3 channel. *Proc Natl Acad Sci* 108(48):19419-24.
- Yang CT, Zeng XH, Xia XM, Lingle CJ. 2009. Interactions between b subunits of the KCNMB family and Slo3: b4 selectively modulates Slo3 expression and function. *PLoS One* 4(7):e6135.
- Zeng X-H, Yang C, Kim ST, Lingle CJ, Xia X-M. 2011. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci* 108(14):5879-84.
- Zheng J, Zagotta WN. 2000. Gating rearrangements in cyclicnucleotide-gated channels revealed by patch-clamp fluorometry. *Neuron* 28(2):369-74.
- Zheng L-P, Wang H-F, Li B-M, Zeng X-H. 2013. Sperm-specific ion channels: targets holding the most potential for male contraceptives in development. *Contraception* 88(4):485-91.

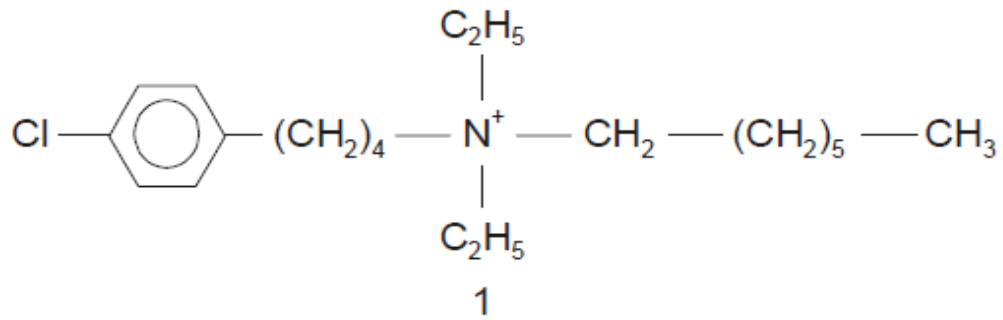
Anexos

Nombre de la enzima
β -N-Acetilglucosaminidasa
Fosfatasa ácida
Acrosina
Arilamidasa
Arilsulfatasa A
Aspartilamidasa
Calpaína II
Catepsina-D

Nombre de la enzima
Dipeptidil peptidasa
Esterasas
β -Galactosidasa
Hialuronidasa
Neuraminidasa
Fosfolipasa A ₂
Fosfolipasa C

Anexo 1. Enzimas hidrolíticas expresadas en el acrosoma de espermatozoides de humano.

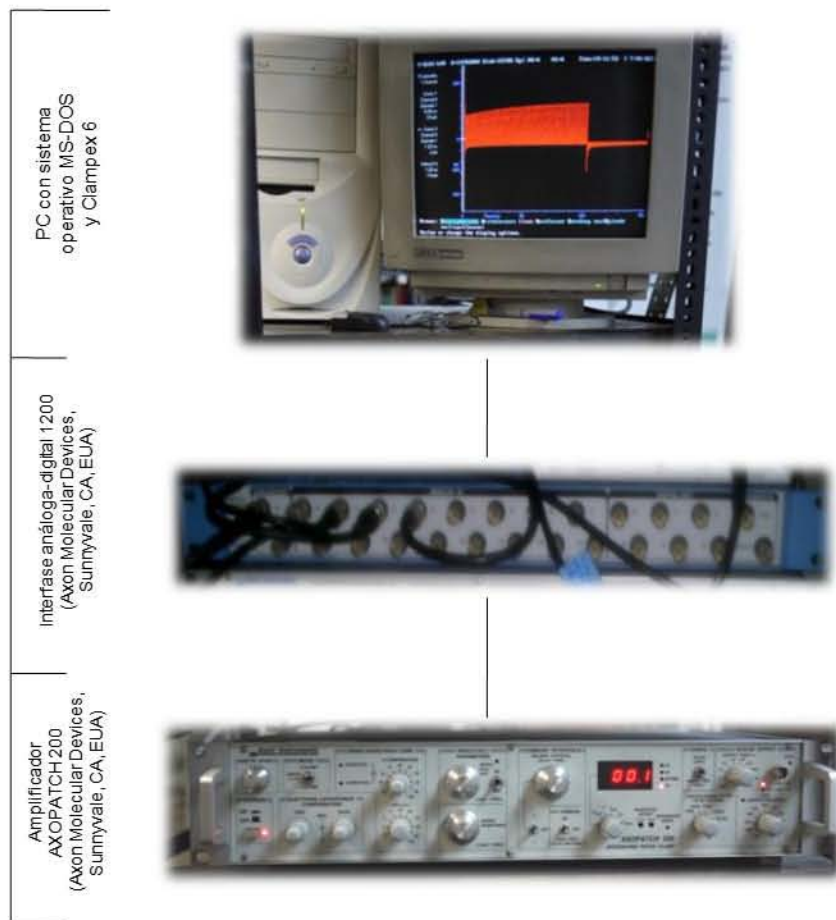
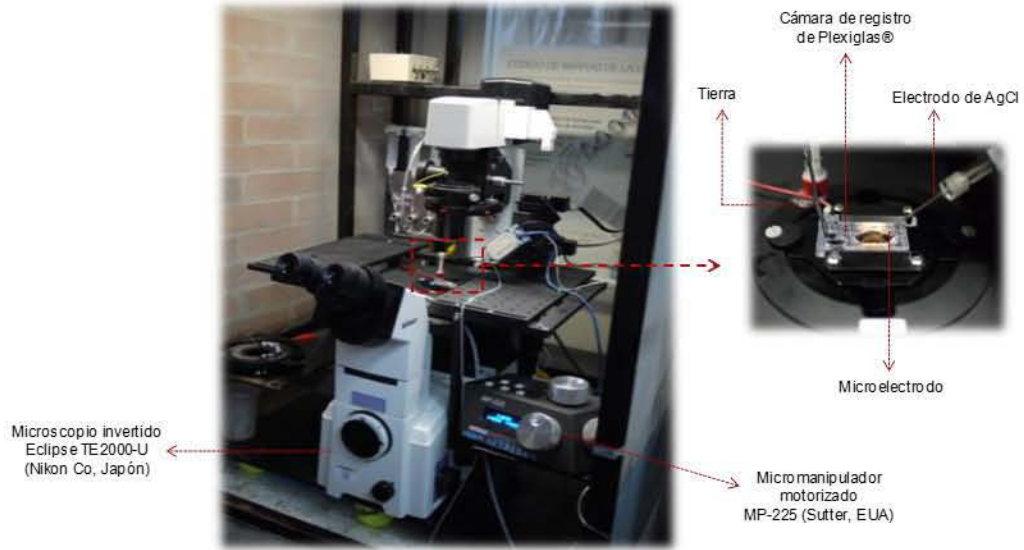
a)



b)

Canal iónico	IC ₅₀	Referencia
Kv1.5	140 nM	Malayer <i>et al</i> , 1995
hERG1	1.37 nM	Kim <i>et al</i> , 2007
Slo2 - Slick	331 μM	Tejeda <i>et al</i> , 2012
Slo2 - Slack	109 μM	
Slo3	25 μM	Navarro <i>et al</i> , 2007

Anexo 2. En a) estructura química del clofilium. En b) tabla de IC₅₀ de clofilium sobre diferentes canales.



Anexo 3. Estación de trabajo de electrofisiología (Fotografías tomadas en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon, en el departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM).